

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

**FACOLTÀ DI AGRARIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN ENTOMOLOGIA AGRARIA**

**XXII CICLO**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza:  
AGR-11, Entomologia generale applicata  
Sede Amministrativa Bologna**

**STUDIO DEL GINANDROMORFISMO NEGLI IMENOTTERI  
DIPRIONIDI**

**Tesi di Dottorato**

**Presentata dal dott. Alessandro Bione**

**TUTORE**

**Dott. Antonio Martini**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie  
Agroambientali

**COORDINATORE**

**Chiar.mo Prof. PIERO BARONIO**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie  
Agroambientali

---

**Esame Finale anno 2010**

*Noi siamo un sottile strato di muschio su un masso voluminoso. Siamo un piccolo fenomeno biologico che produce parole, pensieri, e bambini, ma non arriviamo neanche a solleticare le piante dei piedi al pianeta.*

Kary Mullis

## ABSTRACT

Il ginandromorfismo è il fenomeno per il quale un organismo manifesta contemporaneamente caratteristiche fenotipiche maschili e femminili. Per quanto riguarda la Classe degli Insetti, numerose segnalazioni di tale manifestazione sono reperibili in letteratura, ma un' interpretazione generale sulle origini e sulle cause che la generano non è ancora stata fornita. Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare il fenomeno per quanto riguarda l'Imenottero Diprionide *Diprion pini* (Linnaeus, 1758) attraverso l'allevamento controllato dell'insetto, esperimenti di inincrocio, studio del cariotipo e la valutazione della comparsa e la distribuzione dei tessuti maschili e femminili negli individui ginandromorfi.

Altri parametri biologici (quali i pesi degli individui) sono stati presi in considerazione nel tentativo di fornire una spiegazione riguardo i meccanismi genetici che regolano la determinazione del sesso in questa specie.

**Parole chiave:** Ginandromorfismo, *Diprion pini*, inincrocio, cariotipo, determinazione del sesso.

Gynandromorphism is the phenomenon by which an organism manifests phenotypic characteristics both male and female. For the class of insects, numerous reports of this event can be found in the literature, but a general interpretation of the origins and causes that generate it has not yet been provided. The purpose of this thesis was to study the phenomenon with regard to the Diprionid wasp *Diprion pini* (Linnaeus, 1758) through the controlled rearing of the insect, inbreeding experiments, study of the karyotype and evaluation of the appearance and distribution of male and female tissue in gynandromorph specimens.

Other biological parameters (such as the weights of individuals) were taken into account in an attempt to provide an explanation of the genetic mechanisms that regulate sex determination in this species.

**Keywords:** Gynandromorphism, *Diprion pini*, inbreeding, karyotype, sex determination.

# INDICE

<b>1– INTRODUZIONE .....</b>	<b>6</b>
1.1– IL FENOMENO DEL GINANDROMORFISMO .....	6
1.1.1 – Diffusione del fenomeno.....	6
1.1.2 – Determinazione del sesso negli Imenotteri e origine del ginandromorfismo .....	9
1.2 – MODELLI GENETICI DI DETERMINAZIONE DEL SESSO NEGLI IMENOTTERI .....	13
1.3 – EFFETTI DI MICROORGANISMI SIMBIONTI SULLA DETERMINAZIONE DEL SESSO .....	17
1.3.1 – <i>Wolbachia</i> e ginandromorfismo .....	18
1.4 – IL CASO STUDIO DI <i>DIPRION PINI</i> (LINNAEUS, 1758) .....	18
1.4.1 – Ecologia .....	18
1.4.2 – Biologia .....	20
1.5 – SCOPO DELLA RICERCA.....	23
<b>2 – MATERIALI E METODI .....</b>	<b>24</b>
2.1 – CAMPIONAMENTO DEGLI INDIVIDUI E FORMAZIONE DELLE LINEE DI ALLEVAMENTO .....	24
2.2 – ALLEVAMENTO CONTROLLATO DI <i>D. PINI</i> .....	27
2.2.1 – Condizioni di allevamento .....	27
2.2.2 – Accoppiamento e deposizione delle uova .....	28
2.2.3 – Sgusciamento e accrescimento delle larve .....	30
2.2.4 – Formazione e raccolta dei bozzoli .....	31
2.2.5 – Sfarfallamento degli adulti .....	31
2.2.6 – Creazione degli schemi di accoppiamento .....	32
2.3 – ANALISI SOMATICA DEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI .....	33
2.4 – ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI .....	36
2.5 – STUDIO DEL CARIOTIPO IN <i>D. PINI</i> .....	36
2.6 – DETERMINAZIONE DELLO STATO DI INSEMINAZIONE DELLE FEMMINE .....	38
<b>3 – RISULTATI .....</b>	<b>40</b>
3.1 – PRODUZIONE DI GINANDROMORFI NELL'ALLEVAMENTO CONTROLLATO DI <i>D. PINI</i> .....	40
3.2 – ANALISI DEI PESI ALLO SFARFALLAMENTO DEGLI ADULTI .....	42
3.3 – STUDIO DELLA MASCOLINITÀ DEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI .....	45
3.4 – STUDIO DEL CARIOTIPO IN <i>D. PINI</i> .....	47
<b>4 – DISCUSSIONE .....</b>	<b>49</b>
4.1 – PRODUZIONE DI GINANDROMORFI IN RELAZIONE AL GRADO DI ININCROCIO .....	49
4.2 – ANALISI DEL PESO ALLO SFARFALLAMENTO DEGLI ADULTI .....	50

4.3 – STUDIO DELLA MASCOLINITÀ .....	52
4.4 – ANALISI DEL CARIOTIPO .....	54
4.5 – CONCLUSIONI .....	55
<b>5 – BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>
<b>6 – APPENDICE .....</b>	<b>64</b>
6.1 – SCHEMI DI ACCOPPIAMENTO DELLE LINEE DI ALLEVAMENTO .....	64
6.2 – SCHEMI DI DISTRIBUZIONE DEI TESSUTI NEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI .....	69
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>95</b>

# 1 – INTRODUZIONE

## 1.1 – IL FENOMENO DEL GINANDROMORFISMO

### 1.1.1 – Diffusione del fenomeno

Il ginandromorfismo è il fenomeno per il quale un individuo manifesta contemporaneamente caratteristiche maschili in talune parti del corpo e femminili nelle parti rimanenti (Morgan, 1905).

Laugè (1985) estende il concetto di ginandromorfismo sostenendo che un individuo ginandromorfo è costituito da tessuti geneticamente e fenotipicamente maschili e femminili.

Numerose segnalazioni di individui ginandromorfi sono state riportate nel corso degli anni per diversi taxa: esistono alcune segnalazioni di fenomeni di ginandromorfismo tra gli animali superiori per la classe degli Uccelli (Lillie, 1931; Espinasse, 1934; DaCosta *et al.*, 2009); mentre il fenomeno è stato segnalato e studiato per numerosissimi Artropodi, come ad esempio nei Crostacei Brachiopodi del genere *Branchinecta* (Sassaman & Fugate, 1997) e in *Daphnia magna* (Müller, 1785) (Olmstead & LeBlanc, 2007).

Per quanto riguarda la Classe degli Insetti, numerose sono le descrizioni all'interno dell'Ordine dei Lepidotteri, come per il Saturnide *Periga circumstans* (Walker, 1855) (Moraes, 2005), il Nottuide *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Gemeno *et al.*, 1998) e il Pieride *Eurema hecabe* (Linnaeus, 1758) (Narita *et al.*, 2009).

Altre segnalazioni riguardano l'Ordine degli Ortoteri per l'Acridide *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Pener, 1964) e l'Ordine dei Ditteri per il Limonide *Dicranomyia Mitis* (Meigen, 1830) (Geiger, 1983) e per il Drosophilide *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Garcia-Bellido & Merriam, 1969).

Per quanto riguarda l'Ordine degli Imenotteri, il fenomeno è stato osservato e studiato in maniera ancora più approfondita; numerosi autori infatti descrivono la comparsa di individui ginandromorfi, come nel caso degli Imenotteri Agaonidi *Pegoscapus tonduzi* (Grandi, 1919) e *Blastophaga psenes* (Linnaeus, 1758) (Pereira *et al.*, 2003), negli Encirtidi (Wilson, 1962), negli Alictidi (Wcislo *et al.*, 2004), nei Calcidoidei (Kamping *et al.*, 2007) e nei Diprionidi (Heliövaara *et al.*, 1992; Beaudoin *et al.*, 1994; Martini *et al.*, 1999).

Questo tipo di manifestazione è dunque presente in maniera trasversale in tutta la Classe, ed è probabile che, nonostante la scarsa frequenza con cui individui anomali vengono ritrovati in popolazioni naturali e ottenuti mediante tecniche di allevamento, il fenomeno sia addirittura sottostimato e che coinvolga in realtà un numero di specie di Insetti (tralasciando gli altri gruppi animali) molto superiore.

Malgrado numerosi tentativi di spiegazione, il fenomeno non è ancora stato compreso completamente, in quanto la difformità di modalità riproduttive e meccanismi genetici di determinazione del sesso che riguardano i diversi gruppi animali rendono difficoltosa una generalizzazione in tal senso.

Limitatamente alla Classe degli Insetti, sono stati proposti nel corso degli anni diversi modelli per tentare di spiegare e prevedere la comparsa di individui ginandromorfi; in seguito verranno descritti solamente quelli proposti relativi agli Imenotteri, che per le loro peculiari caratteristiche riproduttive si differenziano dagli altri Ordini.





**Fig. 1.1** – Tavola riassuntiva sul ginandromorfismo curata da Guido Grandi.



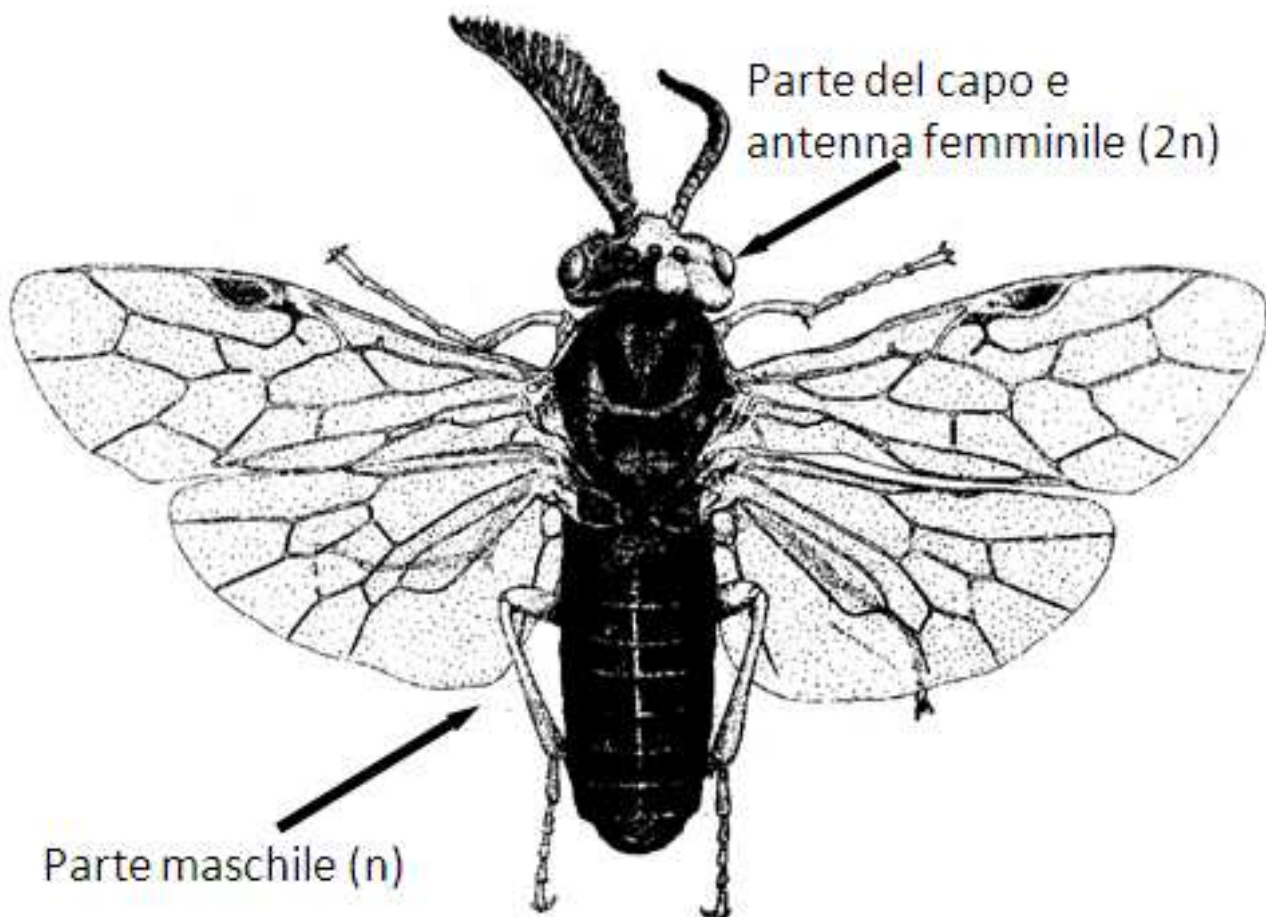
### 1.1.2 – Determinazione del sesso negli Imenotteri e origine del ginandromorfismo

Essendo il ginandromorfismo un'anomalia che riguarda caratteri sessuali nel soma dell'individuo, è importante conoscere i meccanismi che regolano la determinazione del sesso negli organismi studiati, in quanto questi sono fondamentali nella biologia dello sviluppo dell'individuo, e una loro accurata regolazione è necessaria per il successo riproduttivo e dunque per la sopravvivenza della specie (Manolakou *et al.*, 2006) .

A differenza di altri gruppi di Insetti (come ad esempio i Lepidotteri e i Ditteri), gli Imenotteri non possiedono particolari cromosomi sessuali separati e distinti rispetto agli autosomi, ma il sesso dell'individuo viene determinato dal grado di ploidia delle cellule che lo costituiscono. Questa modalità riproduttiva è chiamata aplodiploidia, la differenza tra i due sessi è determinata a livello del numero cromosomico delle cellule: i maschi sono aploidi (con numero cromosomico =  $n$ ) e le femmine diploidi (con numero cromosomico =  $2n$ ).

Generalizzando quindi, negli Imenotteri le femmine vengono originate da uova fecondate, mentre i maschi da quelle non fecondate (partenogenesi arrenotoca) (Heimpel & de Boer, 2008).

Negli Imenotteri dunque, gli individui ginandromorfi sarebbero costituiti da due distinte popolazioni cellulari: una aploide, che andrebbe a costituire la parte maschile, e una diploide, con caratteristiche femminili (Figura 1.2)

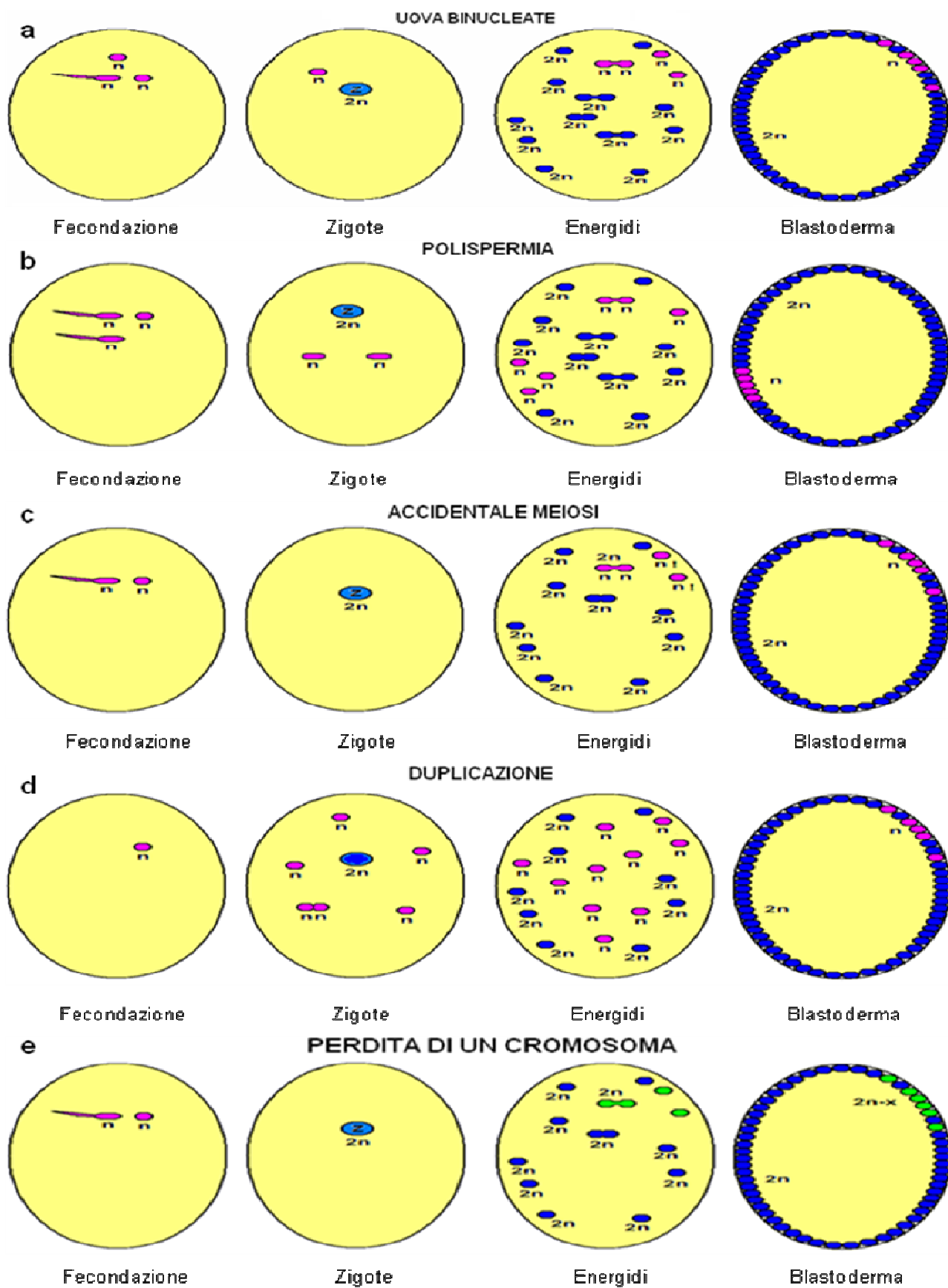


**Fig 1.2** – Ginandromorfo di *Neodiprion sertifer* (Geoffroy). Individuo che presenta nella parte destra del capo caratteristiche femminili (diploidi) e nel resto del corpo caratteristiche maschili (aploidi) (Martini *et al.*, 1999).

Diverse interpretazioni sono state fornite per spiegare l'originarsi della manifestazione del ginandromorfismo, la maggior parte delle quali riguardano anomalie o aberrazioni che interessano e coinvolgono le primissime fasi dello sviluppo dell'insetto:

- **Anomalie oogenetiche:** Sono dovute alla formazione di uova binucleate, la fecondazione da parte di uno spermatozoo riguarderebbe quindi solo un nucleo; questo fenomeno può avere origine come risultato della divisione del nucleo di un oocita (teoria post-riduzionale) (Whiting & Stancati, 1931), oppure tali uova possono originarsi durante la seconda divisione dell'oocita: i due nuclei deriverebbero quindi da quello dell'oocita di secondo ordine e da quello di un nucleo polare (teoria pre-riduzionale) (Figura 1.3 a).

- **Anomalie della fecondazione:** Sono solitamente associate alla polispermia: la divisione di uno spermatozoo accessorio potrebbe dare origine ai tessuti maschili, mentre lo zigote normalmente prodotto originerebbe i tessuti femminili, come nel caso di *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hym., Apidae) (Rothenbuhler *et al.*, 1952) (Figura 1.3 b).
- **Aberrazioni citogenetiche:** In seguito alla fecondazione dell'uovo e alla formazione dello zigote, questo potrebbe andare incontro ad una accidentale meiosi, dando origine a popolazioni cellulari aploidi in seno ad un embrione diploide (Figura 1.3 c); al contrario, una mitosi aberrante con susseguente mancata divisione cellulare potrebbe portare alla formazione di una popolazione cellulare diploide all'interno di un embrione aploide (Figura 1.3 d). Infine, un individuo ginandromorfo potrebbe generarsi in seguito alla perdita di un cromosoma (o parte di esso) contenente i geni relativi alla determinazione del sesso durante la proliferazione cellulare (Nilsson, 1987) (Figura 1.3 e).



**Fig. 1.2** – Diverse interpretazioni dell'origine del fenomeno del ginandromorfismo negli Imenotteri. Uova binucleate (a), polispermia (b), accidentale meiosi (c), duplicazione (d) e perdita di un cromosoma (e). Disegni: A. Martini.

## 1.2 – MODELLI GENETICI DI DETERMINAZIONE DEL SESSO NEGLI IMENOTTERI

In aggiunta ai modelli classici di determinazione del sesso negli Imenotteri, recenti studi hanno dimostrato che il grado di ploidia da solo non è sufficiente a spiegare i meccanismi che determinano il sesso dell'individuo. Il ritrovamento di maschi diploidi in *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Hym., Apidae) (Hoshiba *et al.*, 1995), femmine aploidi in *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hym., Pteromalidae) (Beukeboom *et al.*, 2007), e individui di entrambi i sessi triploidi in *B. terrestris* e *Athalia rosae* (Linnaeus, 1758) (Hym., Tenthredinidae) (Naito & Suzuki, 1991; Ayabe *et al.*, 2004) per citarne alcuni, ha portato a formulare nuove ipotesi riguardo ai meccanismi che regolano la determinazione del sesso negli Imenotteri.

Secondo questi nuovi modelli, il sesso sarebbe determinato non solo dalla composizione quantitativa dei cromosomi, ma anche da quella qualitativa, e inoltre altri fattori esterni al genoma concorrerebbero alla definizione del sesso dell'individuo.

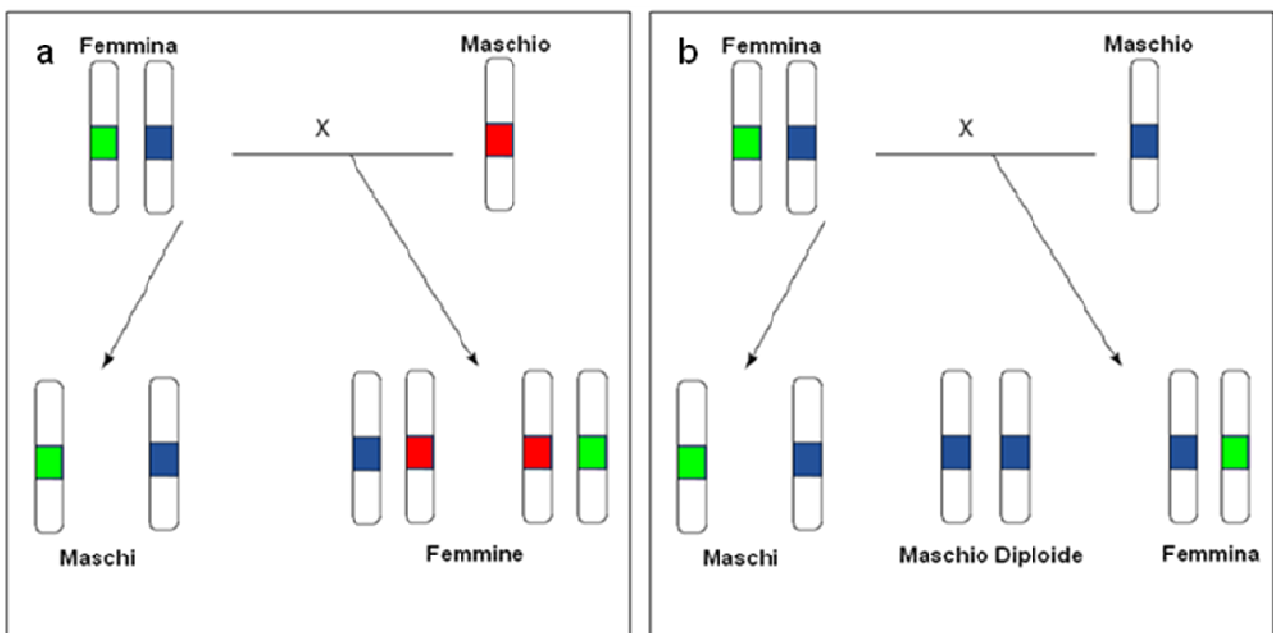
Un esame recente dei modelli sino ad ora proposto è reperibile in Heimpel & de Boer (2008), di seguito passeremo in rassegna i modelli che ad oggi sono stati meglio caratterizzati.

- **Single locus complementary sex determination (sl-CSD):** Secondo questo modello il sesso di un individuo è determinato a livello di un singolo locus genico, individui eterozigoti per questo locus si sviluppano come femmine, mentre individui omozigoti (o emizigoti) come maschi (Evans *et al.*, 2004). Il trascritto di questo locus, infatti, sarebbe una proteina della famiglia SR (famiglia di proteine ricche in serina e arginina coinvolte nello splicing- e quindi nella maturazione dell'mRNA) (Beye *et al.*, 2003), che promuoverebbe lo sviluppo femminile solo in forma eterodimerica, mentre sarebbe inattiva (e porterebbe dunque alla formazione di un maschio) qualora fosse in forma monomerica o omodimerica (Beye, 2004). Secondo questo modello dunque, l'incrocio tra individui consanguinei (che condividono il medesimo allele per il locus pertinente alla determinazione del sesso) potrebbe portare alla formazione di maschi diploidi, che si sono solitamente rivelati essere vitali ma a fertilità ridotta o assente (Cowan & Stahlhut, 2004).

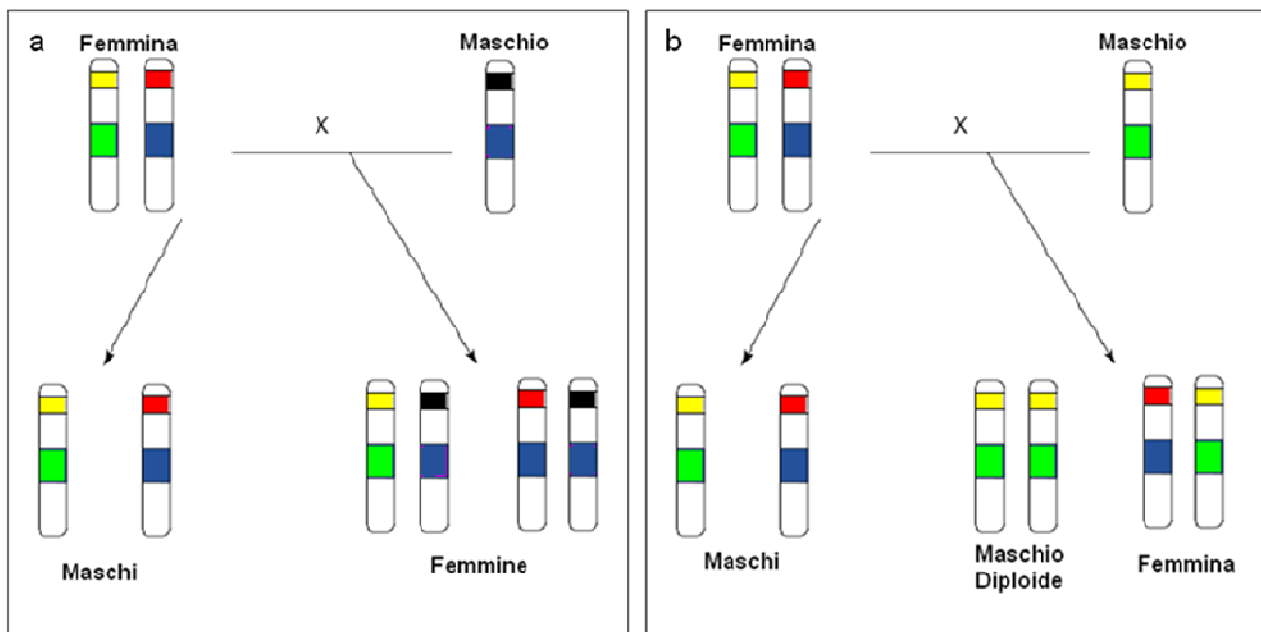
Questo modello è stato validato per numerose specie attraverso studi concernenti la sex ratio, prove citologiche (numero di cromosomi), prove morfologiche (dimensioni, peso degli individui), genetiche ed elettroforetiche (analisi dei microsatelliti e allozimi) (van Wilgenburg *et al.*, 2006). Attualmente, questo modello è ritenuto il più ancestrale e diffuso tra quelli proposti per la determinazione del sesso negli Imenotteri (Salin *et al.*, 2004).

Uno schema esplicativo sul meccanismo d'azione di questo modello è reperibile in figura 1.3, mentre un elenco di specie per le quali questo modello è stato proposto e validato è presente in figura 1.5.

- **Multiple locus complementary sex determination (ml-CSD):** Il meccanismo di determinazione del sesso è il medesimo del modello in precedenza descritto, ma i locus coinvolti nella determinazione del sesso sono due o più. Anche in questo caso, l'inincrocio (inbreeding) all'interno di una popolazione porterebbe alla comparsa di maschi diploidi che presenterebbero omozigosi per tutti i loci riguardanti la determinazione del sesso. Questo modello è stato validato per *Cotesia vestalis* (Haliday, 1834) (Hym., Braconidae) (de Boer *et al.*, 2008) e per *A. rosae* (Naito & Suzuki, 1991) (Figura 1.4).



**Fig. 1.3** – Schema di determinazione del sesso secondo il modello del **si-CSD**. a: situazione in cui gli individui parentali possiedono alleli diversi (indicati da colori diversi) per il locus di determinazione del sesso e danno quindi origine a progenie normale (maschi aploidi e femmine diploidi). b: nel caso in cui i parentali condividano il medesimo allele per la determinazione del sesso, la progenie prodotta sarà composta da maschi e femmine normali e da individui fenotipicamente maschili ma genotipicamente diploidi. Da Evans *et al.* (2004).



**Fig. 1.4** – Schema di determinazione del sesso secondo il modello del **ml- CSD**. a: situazione in cui gli individui parentali possiedono alleli diversi per i loci coinvolti nella determinazione del sesso (indicati da colori diversi), dando quindi origine a progenie normale (maschi aploidi e femmine diploidi). b: nel caso in cui i parentali condividano i medesimi alleli per la determinazione del sesso per entrambi i loci, la progenie prodotta sarà composta da maschi e femmine normali e da individui fenotipicamente maschili ma genotipicamente diploidi. Da Evans *et al.* (2004) modificato.

- **Genomic imprinting sex determination (GISD):** In questo modello il gene per la determinazione del sesso di origine materna diviene il gene per la determinazione del sesso nello zigote (maternal imprinted gene). Le uova aploidi quindi contengono solamente il gene per la determinazione del sesso di origine materna, e si sviluppano come maschi. Uova diploidi contengono anche una copia del gene di origine paterna (paternal nonimprinted gene) e si sviluppano come femmine (Heimpel & de Boer, 2008). Questo modello è stato proposto per la determinazione del sesso di *N. vitripennis*, e sembra essere particolarmente diffuso all'interno della superfamiglia dei Calcidoidei (Dobson & Tanouye, 1998).
- **Genic balance sex determination (GBSD):** La determinazione del sesso è la risultante del bilancio tra geni che determinano il sesso maschile (non-cumulativi) e tra geni determinanti il sesso femminile (cumulativi); le variazioni alleliche non alterano il bilancio. In individui aploidi, il peso combinato dei fattori determinanti maschili supererebbe quello dei fattori femminili, con la risultante di un individuo maschio. In individui diploidi invece, il peso dei fattori genetici femminili cumulativi supererebbe quello dei fattori maschili dando luogo ad una femmina. Algebricamente



la teoria è espressa come  $2F > M > F$ , laddove le lettere rappresentano il peso dei fattori genetici maschili e femminili in individui aploidi e diploidi (Cunha & Kerr, 1957). Questo modello non ha incontrato grossi favori, soprattutto in virtù del fatto che implicherebbe un'influenza maggiore di alcuni loci (determinatori femminili) rispetto ad altri (determinatori maschili) (Crozier, 1971).

- **Maternal effect sex determination (MESD):** Secondo questo modello il sesso è determinato attraverso il rapporto tra prodotti nucleari e citoplasmatici. Componenti citoplasmatici di origine materna inducono lo sviluppo di un maschio in organismi aploidi, mentre in organismi diploidi prevalgono componenti di origine nucleare che promuovono lo sviluppo femminile (Cook, 1993).

**Sub-order Symphyta**  
**Family Tenthredinidae**

*Athalia rosae*

**Family Diprionidae**

*Neodiprion nigroscutum*

*Neodiprion pinetum*

**Sub-order Apocrita Infra-order Parasitica**

**Family Braconidae**

*Aphidius rhoplosiphi*

*Bracon brevicornis*

*Bracon hebetor*

*Bracon serinopae*

*Cotesia rubecula*

*Cotesia glomerata*

*Microplitis croceiceps*

**Family Ichneumonidae**

*Bathyplectes curculionis*

*Diadegma armillata*

*Diadegma chrysostictos*

*Diadegma eucerocephala*

*Diadegma fabriciane*

*Diadegma fenestralis*

*Diadegma insulare*

*Diadegma pulchellus*

*Diadromus pulchellus*

*Heteropelma scaposum*

*Venturia canescens*

**Sub-order Apocrita Infra-order Aculeata**

**Family Vespidae**

*Ancistrocerus antilope*

*Euodynerus foraminatus*

*Liostenogaster flavolineata*

*Mischocyttarus immarginatus*

*Polistes apachu*

*Polistes chinensis antennalis*

*Polybioides tabidus*

*Vespa crabro*

**Family Apidae**

*Andrena scotica*

*Apis cerana*

*Apis mellifera*

*Augochlorella striata*

*Bombus atratus*

*Bombus terrestris*

*Euglossa tridentata*

*Euglossa meriana*

*Euglossa imperialis*

*Euglossa sapphirina*

*Halictus poeyi*

*Lasioglossum zephyrum*

*Melipona compressipes*

*Melipona quadrifasciata*

*Scaptotrigona postica*

*Trigona carbonaria*

*Trigona quadrangula*

**Family Formicidae**

*Acromyrmex heyeri*

*Acromyrmex striatus*

*Leptothorax kutteri*

*Myrmoxenus stumperi*

*Formica aquilona*

*Formica lugubris*

*Formica polyctena*

*Formica pressilabris*

*Formica truncorum*

*Formica rufa*

*Harpagoxenus sublaevis*

*Lasius sakagamii*

*Leptothorax acervorum*

*Leptothorax muscorum*

*Leptothorax nylanderi*

*Pseudolasius emeryi*

*Rhytidoponera chalybaea*

*Rhytidoponera confusa*

*Solenopsis invicta*

**Fig. 1.5** – Elenco di specie di Imenotteri per le quali il modello del single locus - CSD è stato proposto e validato sulle basi di studi condotti sul peso e le dimensioni degli individui ottenuti in popolazioni sottoposte a inincrocio, analisi citologiche sul numero di cromosomi, analisi delle sex ratio e studi di micro satelliti e allozimi (da van Wilgenburg *et al.*, 2006). In rosso, sono state evidenziate due specie di Diprionidi per le quali il modello è stato validato.

### 1.3 – EFFETTI DI MICROORGANISMI SIMBIONTI SULLA DETERMINAZIONE DEL SESSO

In aggiunta ai meccanismi descritti in precedenza, che riguardano la natura genetica degli organismi coinvolti, anche agenti di natura microbica possono influenzare la determinazione del sesso e più in generale l'evoluzione delle sex ratio in popolazioni di insetti (Imenotteri).

Il microorganismo più studiato in questo senso è *Wolbachia*, un  $\alpha$ -proteobatterio simile alle *Rickettsie* (Weeks *et al.*, 2003). Già negli anni '90 questo agente era noto come causa di anomalie riproduttive (Rousset *et al.*, 1992), e con l'avvento di nuove e più raffinate tecniche di indagine molecolare, il suo ruolo e la sua distribuzione sono stati ulteriormente caratterizzati. Attualmente, si ipotizza che almeno il 16% delle specie di Insetti siano infetti, e la percentuale raggiunge il 50% nel caso di insetti neotropici (Stouthamer *et al.*, 1999).

L'infezione da parte di *Wolbachia* è responsabile di diverse anomalie riproduttive negli organismi coinvolti, di seguito sono elencati i più rilevanti.

- **Incompatibilità citoplasmatica:** Questo tipo di anomalia, causata da *Wolbachia*, è dovuta all'instaurarsi di una incompatibilità tra lo sperma e l'uovo, che porta alla morte dell'individuo nel caso di organismi diploidi e la produzione di maschi in organismi aplodiploidi. Questo tipo di incompatibilità può essere unidirezionale (quando un maschio infetto insemina una femmina non infetta, ma non il contrario) oppure bidirezionale, generalmente dovuta al fatto che il maschio e la femmina possiedano differenti ceppi del microorganismo (Werren, 1997).
- **Induzione della partenogenesi:** Questo tipo di alterazione è propria degli Imenotteri, e porta alla produzione di femmine a partire da uova non fecondate (telitochia indotta) (Cook & Butcher, 1999). Il batterio agirebbe interrompendo la prima mitosi dell'uovo a livello dell'anafase, portando alla formazione di un nucleo diploide in un uovo non fecondato (duplicazione gametica). Questo meccanismo non funzionerebbe per insetti con determinazione del sesso del tipo CSD, poiché l'individuo diploide prodotto presenterebbe una omozigosi per tutti i loci determinanti il sesso, risultando pertanto maschio (cfr. paragrafo 1.2).

### 1.3.1 – *Wolbachia* e ginandromorfismo

Il fenomeno del ginandromorfismo è stato messo in relazione con le infezioni di *Wolbachia* da (Stouthamer, 1997) per alcune specie del genere *Trichogramma* e per *Ooencyrtus submetallicus* (Howard, 1910) (Hym., Encyrtidae) (Wilson & Woolcock, 1960), e in particolare con la temperatura di allevamento degli insetti (femmine durante lo sviluppo e ovideponenti): a basse temperature di allevamento (26 °C) viene ottenuta una progenie solo femminile, mentre ad elevate temperature (oltre 30 °C) la progenie è composta esclusivamente da maschi. A temperature intermedie, (28-30 °C) molti imenotteri telitochi producono maschi, femmine e ginandromorfi: l'interpretazione che viene fornita è che il fenomeno della duplicazione gametica, a queste temperature intermedie, sia in un qualche modo inibito e che si manifesti solo in seguito in uno o più nuclei di una divisione seguente. Secondo questo modello quindi, le proporzioni dei tessuti maschili e femminili sul soma dell'individuo ginandromorfo dipenderebbero dal momento in cui la duplicazione gametica si verifica (a livello della seconda divisione mitotica il rapporto sarebbe 1F:2M, alla terza 1F:7M e così via).

## 1.4 – IL CASO STUDIO DI *DIPRION PINI* (LINNAEUS, 1758)

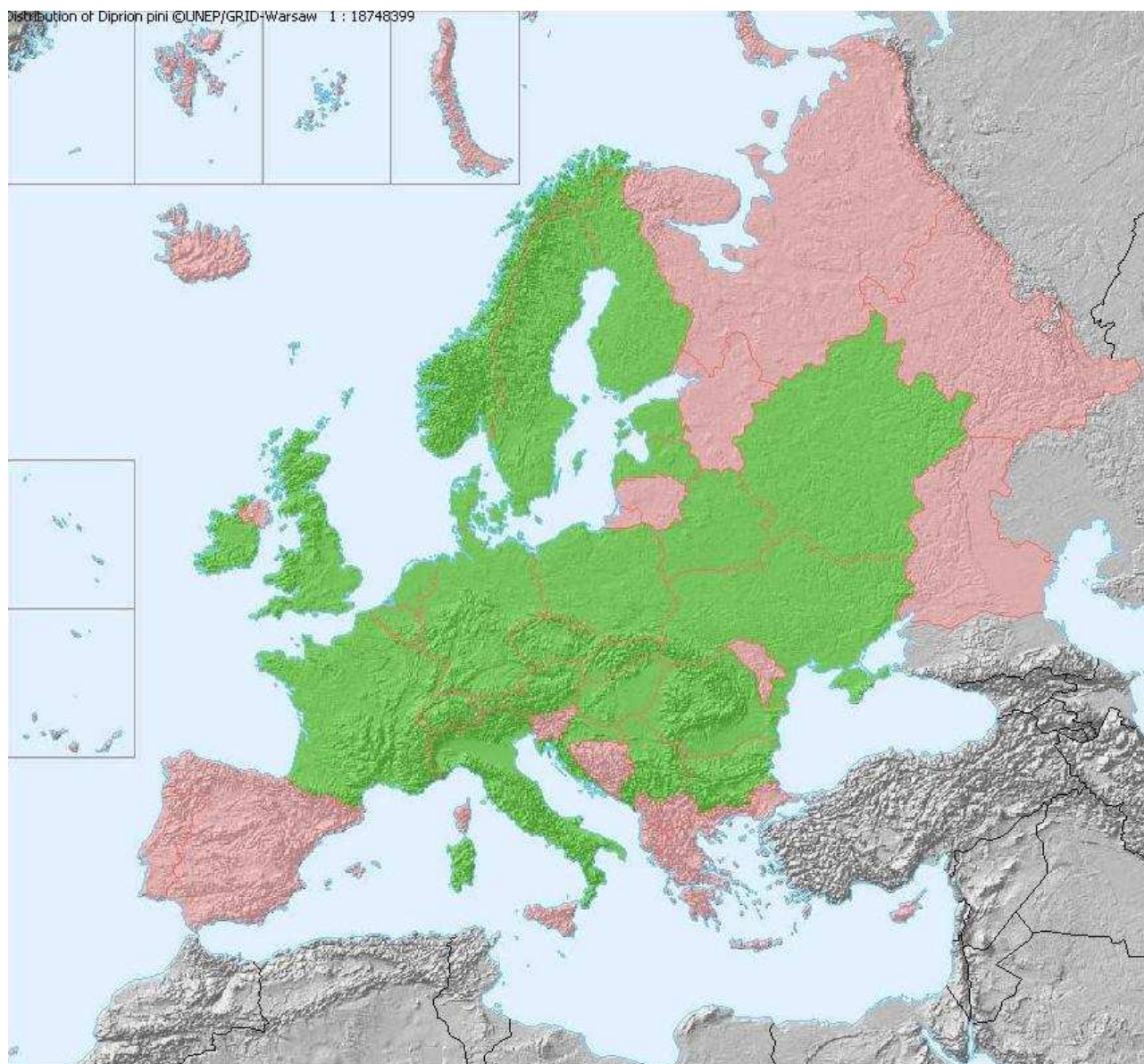
### 1.4.1 – Ecologia

*Diprion pini* è un Imenottero Diprionide defogliatore che si nutre a spese di foglie di piante del genere *Pinus*. Il substrato alimentare d'elezione è il *Pinus sylvestris* (Linnaeus, 1753), ma l'insetto può attaccare altri rappresentanti del genere; in ordine di preferenza *P. nigra* (nelle varietà *austriaca*, *corsicana* e *cebennensis*), *P. uncinata*, *P. radiata*, *P. contorta*, *P. banksiana* e *P. pinaster* (Barre *et al.*, 2002).

L'insetto è presente in Europa, la sua distribuzione va dai Pirenei a ovest, fino alla Bielorussia a est, dalla penisola scandinava a nord, fino a Bulgaria e Serbia a sud (van Achterberg *et al.*, 2008) (Figura 1.6).

In Italia la distribuzione comprende le zone alpine di Trentino Alto Adige, Lombardia e Piemonte (Pornbacher, 1992), ma è presente anche una segnalazione della presenza dell'insetto in Sicilia, nella zona dell'Etna (Turrisi & Bella, 1999).

Il numero di generazioni che l'insetto compie durante l'anno varia in relazione alla latitudine e all'altitudine dei luoghi di sviluppo: in alta montagna e in Europa settentrionale è monovoltino, mentre nelle regioni europee centrali e meridionali è bivoltino (Geri, 1988).

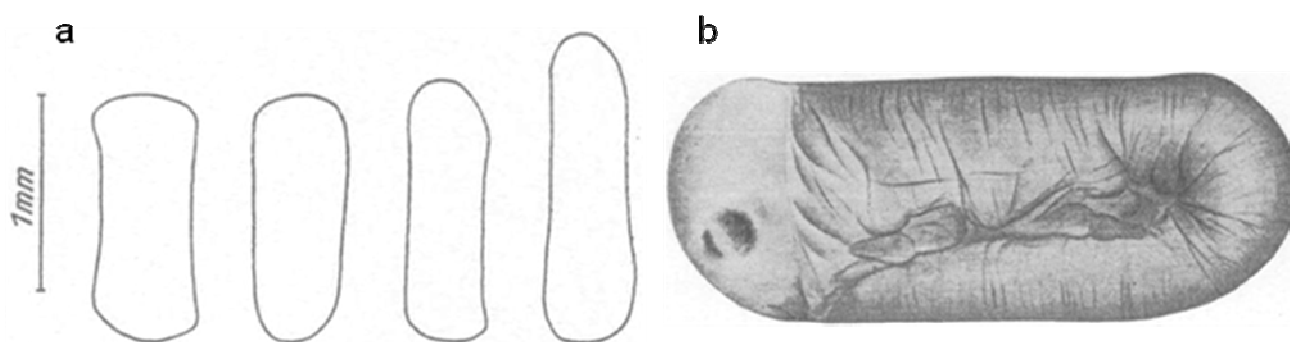


**Fig 1.6** – Areale di distribuzione di *D. pini* in Europa. In verde, nazioni in cui la presenza è stata segnalata, in rosa, nazioni in cui l'insetto non è presente (da [www.faunaeur.com](http://www.faunaeur.com)).

### 1.4.2 – Biologia

#### Uova

L'uovo appena deposto ha forma ovale - allungata, ha una colorazione giallo-biancastra e misura mediamente 1,428-1,462 millimetri (Eliescu, 1932b). Le femmine depongono le uova mediante l'utilizzo dell'ovopositore morfologico incidendo la superficie dell'ago di pino; queste sono sistemate una di seguito all'altra e vengono poi ricoperte da una secrezione ghiandolare di colore brunastro. Di solito ogni femmina depone le uova in un unico germoglio, situazione che aiuta le larve a condurre, fin dalla schiusa, una vita gregaria formando gruppi consistenti di individui. La durata dello sviluppo embrionale può variare da una a cinque settimane, in relazione alla temperatura ed all'umidità (Escherich, 1942) (Figura 1.7).



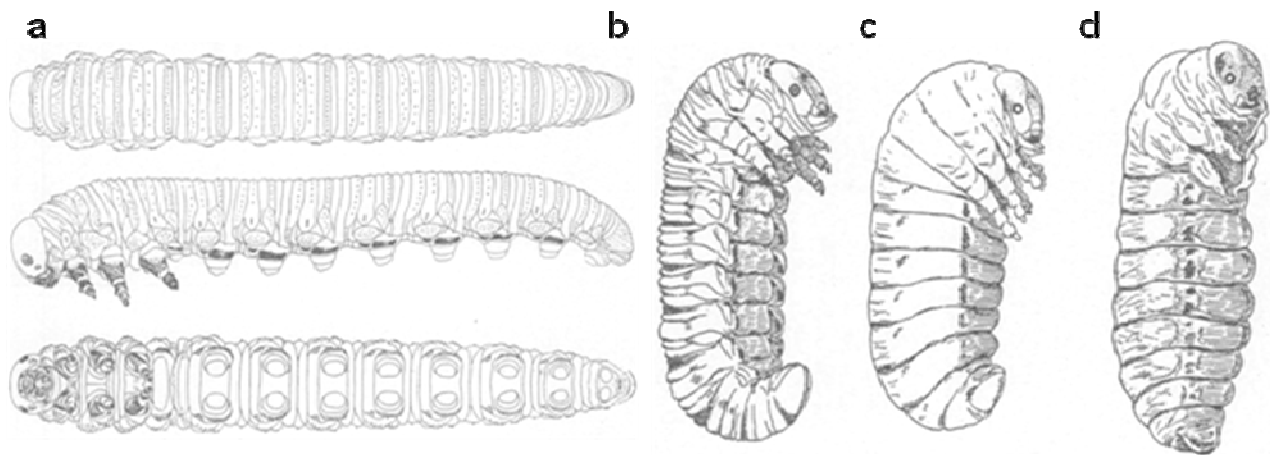
**Fig. 1.7** – a: Diverse forme delle uova di *D. pini*, b: embrione (da Eliescu, 1932b).

#### Larve

Le larve, di tipo eruciforme e di colore giallo-verde, sgusciano rompendo il corion lungo linee predeterminate di minor resistenza che si trovano vicino al polo cefalico dell'uovo (Pornbacher, 1992) e cominciano a nutrirsi dell'ago nelle vicinanze dell'ovatura, che, però, viene risparmiata. Dopo cinque età larvali per i maschi e sei età per le femmine, l'insetto muta nello stadio di prepupa, che è diviso in due distinte fasi morfologiche: quelle di eoninfa e di proninfa. Le eoninfe cessano di nutrirsi e cercano un luogo adatto all'imbozzolamento nel terreno. La diapausa riguarda lo stadio di eoninfa, e può durare

dagli 8-9 mesi (diapausa normale), fino ad un massimo di quattro anni (diapausa prolungata) (Pschorn-Walcher, 1982)

All'interno del bozzolo si ha la trasformazione in proninfa, dove diventano evidenti gli occhi pupali; tale fase ha, generalmente, una durata di 5-6 giorni. Di seguito si ha la muta in pupa che compie il suo sviluppo in un periodo variabile fra i sei e i dodici giorni (Figura 1.8).



**Fig. 1.8** – Larva di *D. pini* secondo una vista dorsale, laterale e ventrale (a). Eoninfa (b), e proninfa (c-d), dove iniziano ad evidenziarsi gli occhi pupali (da Eliescu, 1932a).

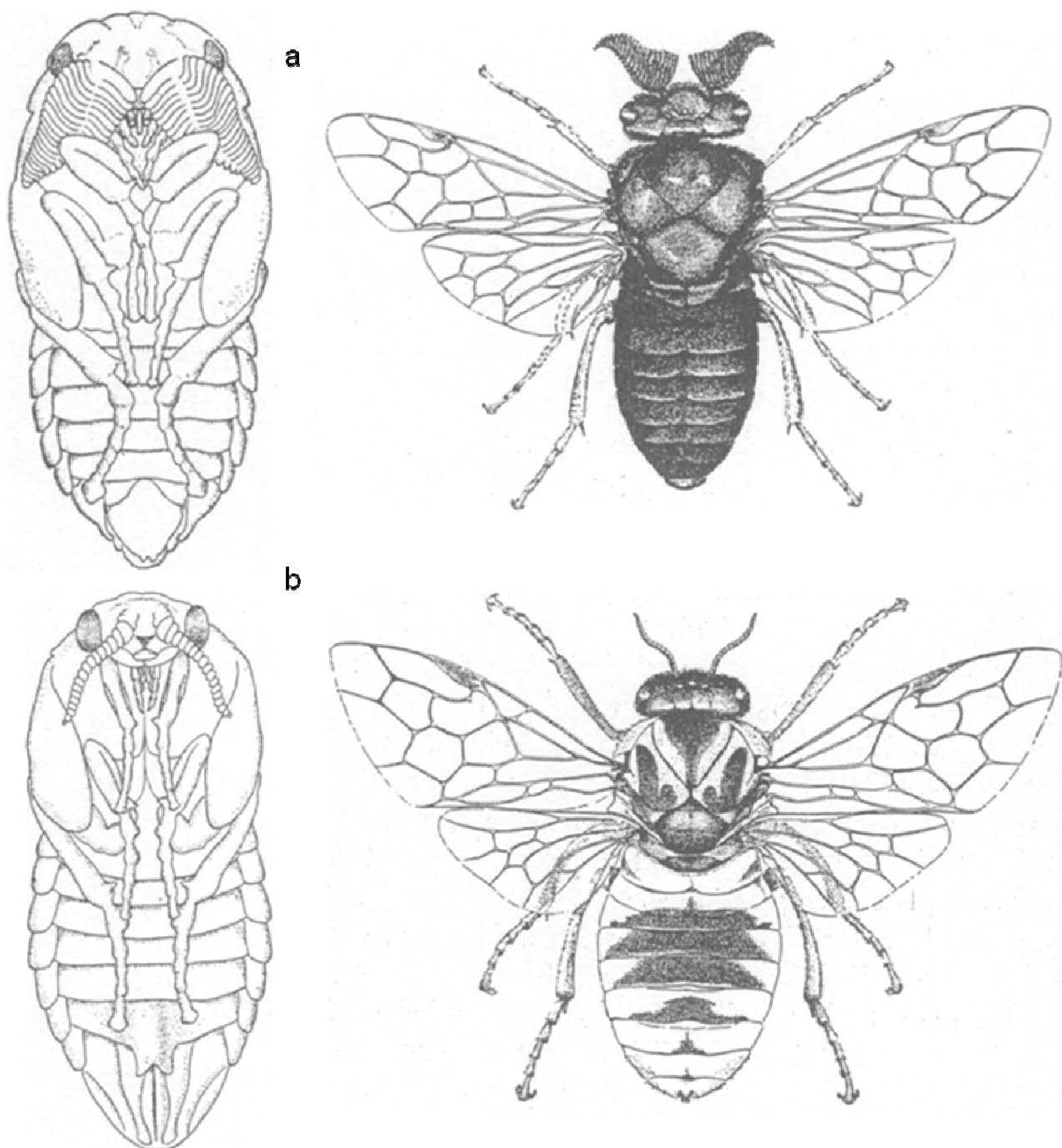
## Adulti

Terminato lo sviluppo pupale, gli adulti di *D. pini* sfarfallano tagliando con le mandibole una calotta perfettamente circolare all'apice del bozzolo. Il dimorfismo sessuale è spiccato in questa specie: i maschi presentano antenne bipettinate, e hanno un'uniforme colorazione nera della testa, del torace e dell'addome. Anche le zampe sono nere nei primi articoli (coxa, trocantere e femore), mentre le tibie e i tarsi sono generalmente di colore giallo-marrone. I maschi misurano mediamente da 7,5 a 9 millimetri (Figura 1.9 a).

Le femmine invece presentano antenne serrate e il capo è nero ma con riflessi rosso-brunastri. Il torace è giallo con la presenza di tipiche macchie nere sul mesonoto (disposte a formare una sorta di "W"); l'addome, anch'esso giallo, presenta un bandeggio nero tra il terzo e il sesto urotergite. Le zampe sono interamente di colore giallo. Le dimensioni della femmina variano da 8,5 a 10 millimetri (Figura 1.9 b) (Eliescu, 1932a).



Le marcate differenze che intercorrono tra maschi e femmine hanno reso piuttosto semplice l'identificazione di individui ginandromorfi all'interno dell'allevamento di *D. pini*, inoltre è stato possibile descrivere dettagliatamente quale fosse la distribuzione dei tessuti maschili e femminili sul soma degli esemplari anomali.



**Fig. 1.9** – Pupa e adulto maschili (a) e pupa e adulto femminili (b) di *D. pini* (da Eliescu, 1932a).



## 1.5 – SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca è stata avviata con l'intento di studiare la manifestazione del ginandromorfismo in *D. pini* partendo dall'allevamento massale presente presso i laboratori del DiSTA, in cui alcuni esemplari ginandromorfi hanno iniziato a comparire a partire dalla primavera del 2007, in modo da studiare in maniera intensiva le modalità e le cause di questo fenomeno da un punto di vista quantitativo (frequenza di comparsa di individui anomali) e qualitativo (descrizione somatica dei ginandromorfi).

Parallelamente a questo, lo studio ha riguardato anche le modalità di riproduzione dell'insetto, nel tentativo di identificare quali meccanismi regolino la determinazione del sesso in questa specie.

## 2 – MATERIALI E METODI

### 2.1 – Campionamento degli individui e formazione delle linee di allevamento

Gli individui utilizzati per le prove sperimentali sono stati ottenuti mediante diversi campionamenti effettuati nel corso degli anni.

Presso i laboratori del DiSTA era presente un allevamento massale originato da individui campionati su piante di *P. sylvestris* in data 10/IX/2005 presso S. Martino in Monte vicino a Bressanone (BZ), e il 12/X/2005 nel comune di S. Dorlingo della Valle, vicino a Trieste. Sono stati campionati individui di età compresa tra la terza e l'ultima età larvale; l'allevamento è proseguito in cella climatizzata a temperatura costante di 20 °C con un fotoperiodo di 17 L:7 B.

Un secondo campionamento è stato effettuato il 20-IX-2007 presso Velturmo (BZ): in questa occasione sono state collezionate 42 larve (di età compresa tra la terza e l'ultima) appartenenti ad un'unica colonia. Da questa colonia sono stati ottenuti 19 maschi, 20 femmine e 3 individui ginandromorfi.

Infine, nel gennaio del 2009, altri individui sono stati forniti dal Dott. Ivo Beyaert (Free University of Berlin, Institute for Biology-Applied Zoology/Ecology of Animals). Segnatamente la popolazione di Berlino era costituita da bozzoli che hanno prodotto 38 maschi e 21 femmine.

Per determinare l'effetto dell'inincrocio sulla produzione di ginandromorfi, sono state create diverse linee di allevamento che sono state mantenute isolate durante il succedersi delle generazioni.

Una prima linea, denominata "Allevamento", è stata avviata facendo ovideporre 8 femmine inserite in una gabbia insieme a 16 maschi (Generazione 0). Questa linea rappresenta gli individui presenti in allevamento massale a partire dal 2005 originata da individui appartenenti a due diversi siti di campionamento. Non essendo state conteggiate le generazioni a partire dalla data di campionamento, è stato possibile risalire al numero di generazioni compiute fino alla data di inizio delle prove di inincrocio (X/2007) attraverso il rapporto tra il tempo trascorso dal campionamento degli esemplari e la durata di sviluppo di una generazione dell'insetto.

Il valore assunto da questo rapporto è 12,2, pertanto è possibile asserire con buona approssimazione che la linea di Allevamento sia stata originata da individui mantenuti in allevamento per 12 generazioni al momento dell'inizio della sperimentazione (per i dati relativi ai tempi di sviluppo, cfr. Tab. 2.2).

La seconda linea creata, denominata "Velturmo", è stata originata da individui sfarfallati dalle larve campionate nel 2007 (Generazione 0); in particolare, per avviare la linea, sono state effettuate 5 ripetizioni inserendo 2 maschi e 2 femmine in ciascuna gabbia di allevamento (Generazione I). Questa linea, originata da una singola colonia di individui, rappresenta dunque una linea selvatica composta da individui con tutta probabilità consanguinei (appartenenti alla medesima colonia).

La terza linea, denominata "Mista", è stata creata incrociando individui delle due linee sopradescritte: inizialmente sono state fatte ovideporre 2 femmine appartenenti alla linea Velturmo inserite in una gabbia con 2 maschi per ciascuna delle due linee (Allevamento e Velturmo, Generazione 0). Qualora ce ne fosse stato bisogno, causa scarsità di individui prodotti, nuovi incroci sono stati eseguiti tra individui delle differenti linee. Questa linea è stata dunque rinsanguata più volte durante il succedersi delle generazioni.

Nel gennaio del 2009, una quarta linea (denominata Berlino) è stata avviata a partire dagli individui forniti dal Dott. Ivo Beyaert; questa linea è stata allevata fino alla III generazione, ma la comparsa di individui ginandromorfi non è stata osservata

L'allevamento degli insetti è dunque proseguito fino alla VII generazione per le linee di Allevamento, Velturmo e Mista, fino alla III per quella di Berlino. Lo schema temporale della successione delle generazioni e del numero di individui utilizzato per ciascuna ripetizione è indicato in Tabella 2.1.

Generazione	Data Inizio	Linee	Maschi per Ripetizione	Femmine per Ripetizione	Ripetizioni con ginandromorfi
<b>0</b>	ott-07	Allevamento	16	8	1
		Velturmo	1	1	1
		Mista	4	2	1
<b>I</b>	dic-07	Allevamento	1	1	2
		Velturmo	2	2	0
		Mista	1	1	1
<b>II</b>	mar-08	Allevamento	1	1	1
		Velturmo	1	1	1
		Mista	1	1	4
<b>III</b>	mag-08	Allevamento	1	1	1
		Velturmo	1	1	1
		Mista	1	1	3
<b>IV</b>	lug-08	Allevamento	1	1	3
		Velturmo	1	1	0
		Mista	1	1	4
<b>V</b>	ott-08	Allevamento	1	1	1
		Velturmo	1	1	0
		Mista	1	1	3
<b>VI</b>	gen-09	<b>Berlino</b>	38	21	0
		Allevamento	1	1	1
		Velturmo	1	1	0
<b>VII</b>	mar-09	Mista	1	1	0
		<b>Berlino</b>	1	1	0
		Allevamento	1	1	2
<b>VII</b>	mar-09	Velturmo	1	1	0
		Mista	1	1	2
		<b>Berlino</b>	1	1	0

**Tab. 2.1** – Successione temporale delle generazioni di *D. pini* durante le prove sperimentali.

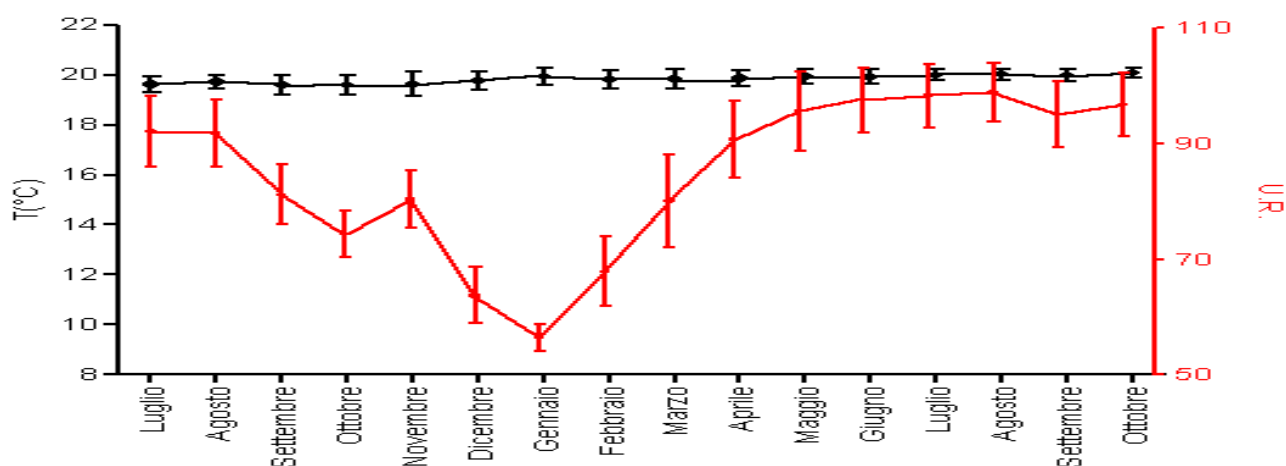
## 2.2 – ALLEVAMENTO CONTROLLATO DI *D. PINI*

### 2.2.1 – Condizioni di allevamento

L'allevamento degli insetti presso i laboratori del DiSTA è stato condotto in cella climatizzata con temperatura costante di 20 °C, umidità relativa compresa tra il 50 e il 100% e fotoperiodo di 17:7 (L:B) per tutta la durata dello sviluppo dell'insetto. La notevole variabilità dei valori di umidità relativa è ascrivibile alla presenza di bottiglie d'acqua necessarie per il mantenimento dei rami di pino utilizzati per l'ovideposizione degli insetti. La cella climatizzata era illuminata da lampade al neon Philips TL-D master (58W/840) a luce bianca. In un precedente lavoro sull'allevamento di *D. pini* Eichhorn (1976) riporta una durata dello sviluppo completo (dalla deposizione delle uova allo sfarfallamento dell'adulto) di 50-55 giorni.

Dai dati ottenuti nelle prove sperimentali, lo sviluppo dell'insetto alle condizioni sopradescritte richiede circa 60 giorni, e segnatamente circa 16 giorni per lo sviluppo embrionale, 28 giorni per lo sviluppo larvale e circa 16 per quello pupale (Tab.2.2). I dati di temperatura ed umidità relativa sono stati acquisiti mediante un termoigrometro digitale "Tinyview Plus ®" (Gemini Data Loggers), il sensore è stato settato in modo da effettuare una misurazione/ora. I dati ottenuti sono poi stati inseriti in un grafico rappresentante i valori medi mensili di temperatura e umidità relativa registrati tra luglio 2008 e ottobre 2009 (Fig. 2.1). Sono state eseguite anche alcune prove di allevamento ad una temperatura di 25°C nel tentativo di riuscire a produrre un maggior numero di generazioni nell'arco di un anno, e sebbene il tempo necessario al completamento di una generazione si riduca a circa 48 giorni, l'allevamento risulta più difficoltoso a causa del maggior disseccamento al quale sono soggetti i rami di pino utilizzati; questo genera effetti negativi sulla capacità delle uova di schiudersi.

Le prove di allevamento alla temperatura di 25°C sono state dunque interrotte in quanto le problematiche riguardanti la produzione di individui superavano i benefici generati da uno sviluppo più rapido dell'insetto.



**Fig 2.1-** Andamento della temperatura (nero) e dell'umidità relativa (rosso) nella cella di allevamento. Medie mensili  $\pm$  deviazione standard

20°C	Embrione	Larva	Pupa	Totale
Media	16,27	28,56	16,36	61,12
Dev. St.	2,32	4,82	2,14	7,19
n	51	50	50	51
25°C	Embrione	Larva	Pupa	Totale
Media	11,67	22,50	14,67	48,83
Dev. St.	0,52	10,17	1,75	10,89
n	6	6	6	6

**Tab. 2.2** – Durata dei vari stadi di sviluppo di *D. pini* (giorni) alle condizioni di allevamento T=20°C e T=25°C , n = numero di ripetizioni saggiate.

### 2.2.2 – Accoppiamento e deposizione delle uova

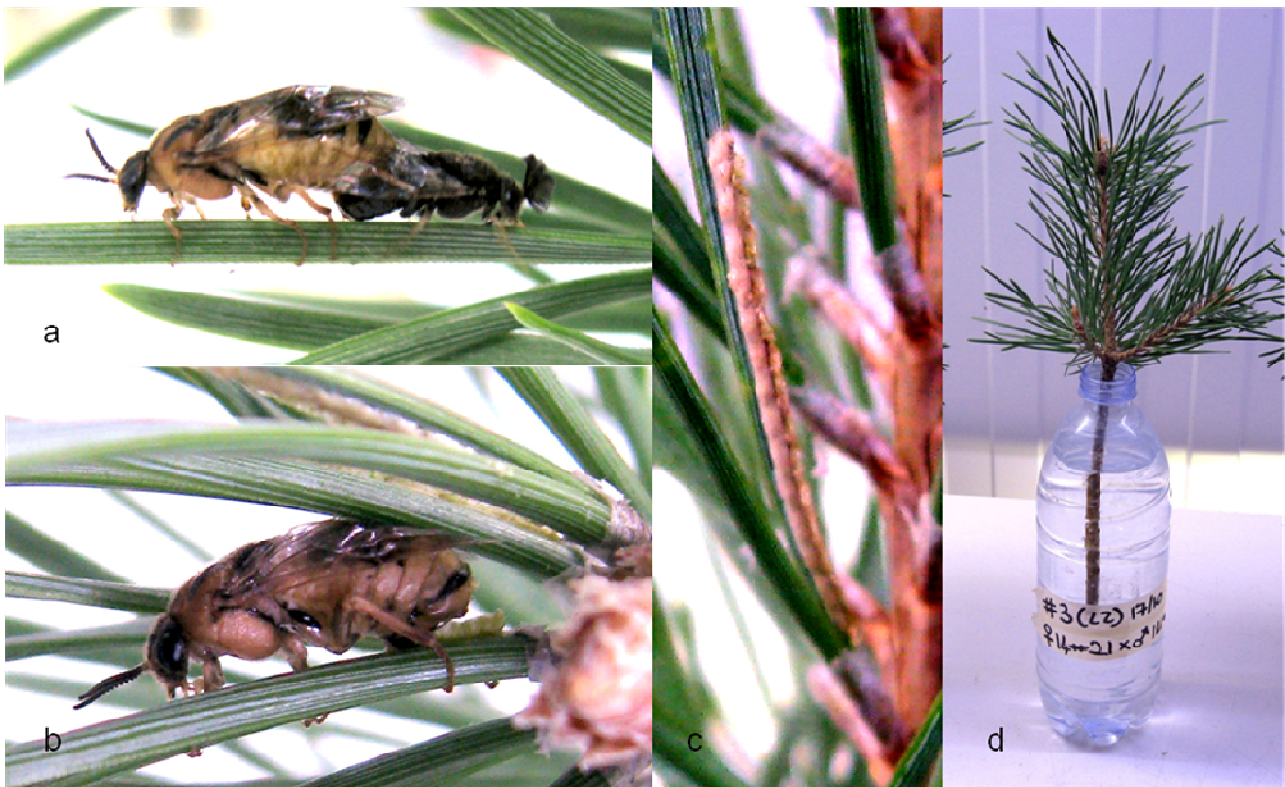
L'accoppiamento e la deposizione delle uova sono stati ottenuti isolando gli adulti in gabbie di plexiglass delle dimensioni di 40X40X30 cm dotate di aperture provviste di rete metallica a maglie sottili per una corretta aerazione. In ciascuna gabbia veniva generalmente inserito un esemplare maschile e un esemplare femminile alla volta, e nel caso in cui uno dei due fosse morto prima dell'ovideposizione, entrambi venivano sostituiti. Per quanto possibile, al fine di verificare l'effetto dell'inincrocio sulla produzione di ginandromorfi, venivano accoppiati individui consanguinei (fratello e sorella). Sono state effettuate anche repliche inserendo nella gabbia solo la femmina, in modo da ottenere una discendenza partenogenetica (solo maschile).

All'interno della gabbia veniva posto un recipiente d'acqua (una bottiglia di plastica da 0,5 L) in cui era inserito un ramo di pino reciso di fresco che fungeva da substrato per l'ovideposizione.

Al fine di mantenere fresco il ramo ed evitare il disseccamento delle uova, a giorni alterni l'acqua veniva sostituita e il rametto era tagliato alla base.

Per ciascuna gabbia così prodotta veniva creata un'etichetta recante un numero progressivo relativo alla generazione, uno relativo alla ripetizione, la sigla della linea di appartenenza (All = linea di Allevamento, Velt = linea di Velturmo, Mix = linea Mista e Ber = linea di Berlino) e il numero identificativo degli individui accoppiati, nonché la data di deposizione delle uova.

Al termine dell'ovideposizione, i rami venivano tolti dalla gabbia e l'etichetta veniva applicata sulla bottiglia in modo da identificare chiaramente il tipo e l'origine dell'accoppiamento eseguito (Fig. 2.2).



**Fig. 2.2** – Particolare dell'accoppiamento (a), della deposizione delle uova (b) e di un'ovatura prodotta (c). A destra, ramo di pino con ovature inserito nella bottiglia d'acqua ed etichetta relativa alla ripetizione (d).



### 2.2.3 – Sgusciamento e accrescimento delle larve

Le giovani larve neo sgusciate venivano inizialmente mantenute sul medesimo ramo sul quale era avvenuta l’ovideposizione in quanto la manipolazione delle stesse nei primi stadi larvali risulta piuttosto problematica; in seguito, quando il ramo iniziava a deteriorarsi, le larve venivano trasferite in una scatola di plastica trasparente (dimensioni 28 x 18 x 12 cm - capacità 5 L) munita di coperchio forato e chiuso con una maglia metallica per consentire un’adeguata aerazione. Anche l’etichetta, aggiornata con la data relativa allo sgusciamento delle larve, veniva trasferita sulla scatola di allevamento (Fig. 2.3).

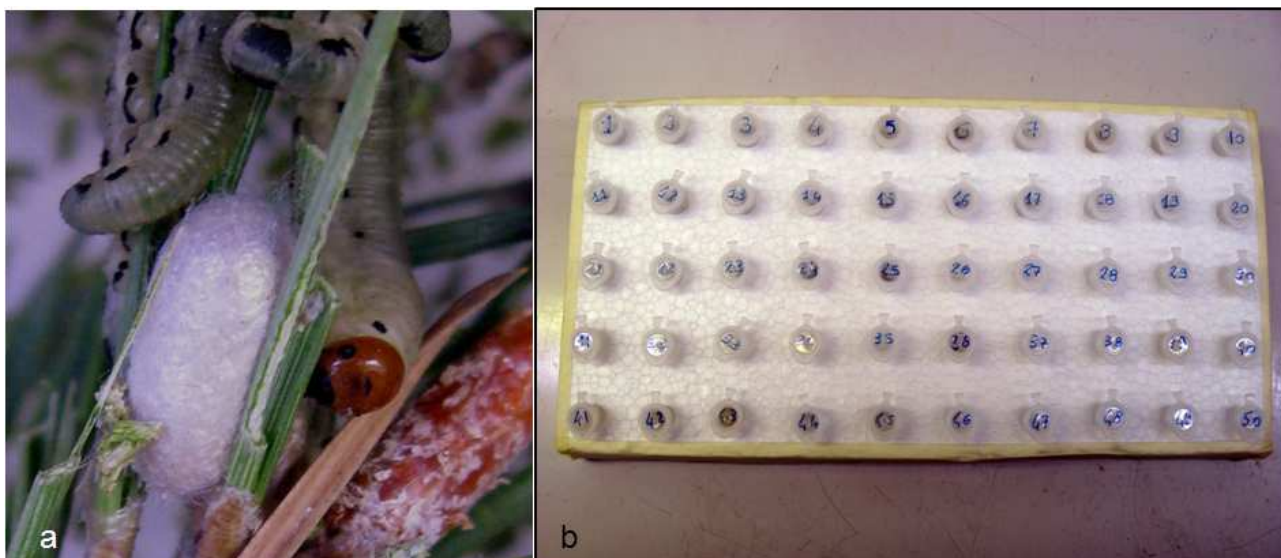
Le scatole venivano controllate e pulite dalle deiezioni delle larve quotidianamente per evitare che non si sviluppassero infezioni virali e fungine potenzialmente letali per la colonia, a giorni alterni invece (o qualora ce ne fosse stato bisogno), nuovi rami di pino freschi venivano aggiunti come substrato alimentare per le larve in accrescimento.



**Fig. 2.3** – Larve neosgusciate (a), in accrescimento (b) e particolari delle scatole di allevamento con relative etichette (c-d).

#### 2.2.4 – Formazione e raccolta dei bozzoli

Terminato lo sviluppo larvale, i bozzoli in formazione venivano raccolti da ciascuna scatola di allevamento e isolati singolarmente in eppendorf numerati con il tappo forato. Questi erano poi inseriti all'interno di pannelli di polistirolo, in modo da mantenere isolati i bozzoli prodotti per ciascuna ripetizione. L'etichetta relativa veniva aggiornata con la data di formazione del primo bozzolo della colonia, e in seguito trasferita sul pannello corrispondente.



**Fig. 2.4** – Dettaglio di un bozzolo di *D.pini* prodotto nell'allevamento (a) e raccogliatore con eppendorf numerate (b).

#### 2.2.5 – Sfarfallamento degli adulti

Terminato lo sviluppo pupale, gli adulti sfarfallati venivano sessati, esaminati in modo da individuare eventuali anomalie somatiche, e pesati entro 36 ore mediante l'utilizzo di una bilancia Mettler AE160 (accuratezza 0,1 mg).

In seguito, una parte degli adulti venivano utilizzati per originare la generazione successiva (cfr. par. 2.2.2). Tutti i dati venivano registrati su apposite tabelle (una per

ciascuna ripetizione effettuata) e in seguito analizzati statisticamente per determinare eventuali differenze tra gli individui delle linee di allevamento (Tab. 2.3).

I pesi di sfarfallamento degli adulti rilevati durante il susseguirsi delle generazioni sono stati utilizzati per effettuare un confronto fra gli individui maschili ottenuti da ripetizioni partenogenetiche (da femmine non inseminate) e anfigoniche (da femmine inseminate). La comparsa di maschi più pesanti generati attraverso riproduzione anfigonica rispetto a quelli partenogenetici (che assumono una sorta di funzione “controllo”) viene infatti interpretata come prova per la comparsa di maschi diploidi all'interno di popolazioni soggette ad inbreeding, e di conseguenza come evidenza a sostegno dell'ipotesi che la specie manifesti una determinazione del sesso di tipo CSD (cfr. par. 1.2) (Beaudoin *et al.*, 1994).

#### 2.2.6 – Creazione degli schemi di accoppiamento

Attraverso l'impiego di questa metodologia di allevamento, è stata ottenuta per ciascun individuo prodotto una sigla identificativa univoca indicante la generazione, la linea di allevamento, la ripetizione e il numero specifico dell'esemplare, ed è stato quindi possibile tracciare esattamente la genealogia delle linee di allevamento studiate.

Al fine di rappresentare graficamente gli incroci eseguiti è stato utilizzato il programma per la creazione di alberi genealogici (GenoPro, 2007). Partendo dalle ripetizioni che hanno prodotto individui ginandromorfi, sono stati quindi creati degli schemi indicanti i rapporti di parentela tra gli insetti ottenuti nelle varie generazioni e la tipologia di prole prodotta (colonie anfigoniche, partenogenetiche, con ginandromorfi). L'analisi statistica dei risultati per quanto riguarda i pesi degli adulti e le frequenze di comparsa di individui anomali è stata eseguita sulla base degli schemi ottenuti (gli schemi prodotti sono riportati in Appendice).

<b>Sesso</b>	<b>#</b>	<b>Peso</b>	<b>Data</b>	<b>Note</b>	<b>Sesso</b>	<b>#</b>	<b>Peso</b>	<b>Data</b>	<b>Note</b>
Maschio	1	30,9	22-gen		Femmina	1			
Maschio	2	29,9	18-gen		Femmina	2			
Maschio	3				Femmina	3	55,8	16-gen	<b>GYN</b>
Maschio	4				Femmina	4	45,7	18-gen	<b>GYN</b>
Maschio	5	45,3	20-gen		Femmina	5			
Maschio	6				Femmina	6	49,1	18-gen	<b>GYN</b>
Maschio	7	Dia			Femmina	7			
Maschio	8	34,2	19-gen		Femmina	8			
Maschio	9	40,8	21-gen		Femmina	9			
Maschio	10	36,9	18-gen		Femmina	10			
Maschio	11				Femmina	11	113,6	19-gen	
Maschio	12				Femmina	12	99,1	21-gen	
Maschio	13				Femmina	13	75,9	21-gen	<b>GYN</b>
Maschio	14				Femmina	14	108,9	21-gen	
Maschio	15				Femmina	15	106,4	20-gen	
Maschio	16				Femmina	16	108,4	20-gen	
Maschio	17				Femmina	17	57,8	22-gen	<b>GYN</b>
Maschio	18				Femmina	18	77,9	22-gen	<b>GYN</b>
Maschio	19				Femmina	19	71,2	20-gen	<b>GYN</b>
Maschio	20				Femmina	20	115,8	20-gen	
Maschio	21				Femmina	21	108,2	19-gen	
Maschio	22				Femmina	22	120,2	20-gen	
Maschio	23	49,2	26-gen		Femmina	23			
Maschio	24				Femmina	24	107,8	27-gen	

**Tab. 2.3** – Esempio di schema di registrazione dei pesi degli adulti sfarfallati. Generazione V, ripetizione 44 (linea Mista). I pesi sono indicati in milligrammi, Dia = individuo a sviluppo non continuo (non sfarfallato), GYN = individuo ginandromorfo.

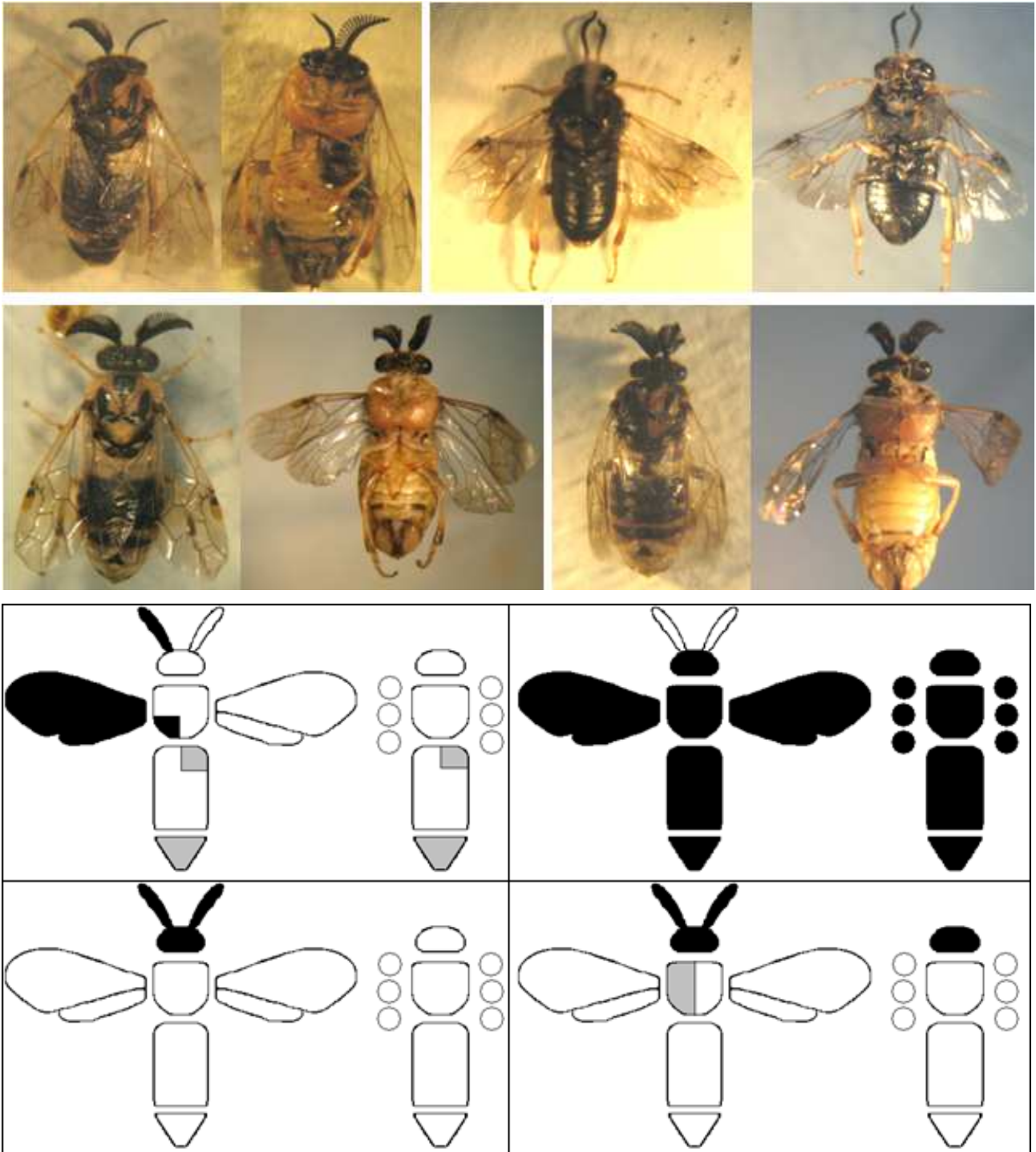
## 2.3 – ANALISI SOMATICA DEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI

Alla comparsa di individui che presentavano anomalie questi venivano pesati come descritto per gli individui normali, e i dati relativi ai pesi erano registrati unitamente a quelli degli altri esemplari della medesima ripetizione (cfr. Tab. 2.3).

In seguito, ciascun individuo ginandromorfo veniva osservato allo stereomicroscopio al fine di determinare quale fosse la distribuzione dei tessuti maschili e femminili nelle diverse parti del corpo dell'animale.

Sono stati creati schemi semplificati raffiguranti una vista dorsale e ventrale del soma degli insetti; le parti maschili venivano indicate in nero, quelle femminili in bianco e quelle intermedie (che presentavano cioè regioni con caratteristiche a mosaico o malformate) in grigio (Fig. 2.5).

Gli schemi raffigurano nell'ordine il capo (e le antenne), il torace, l'addome e i genitali esterni. Sono indicate anche le ali per quanto riguarda la vista dorsale e le zampe per quella ventrale.



**Fig. 2.5** – Rappresentazione schematica degli individui ginandromorfi. In alto, foto di ginandromorfi allo stereomicroscopio secondo una vista dorsale e ventrale. In basso, schemi corrispondenti di distribuzione dei tessuti maschili (in nero), femminili (in bianco) e a mosaico (in grigio).

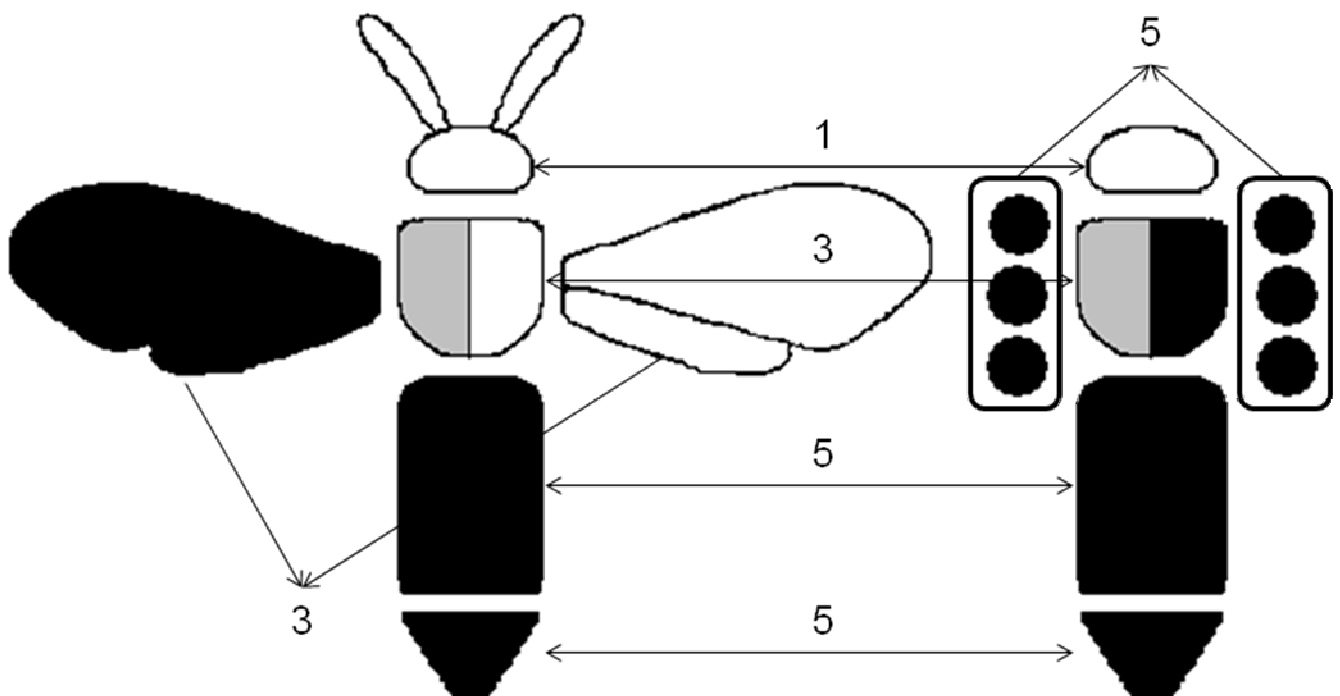


Una volta prodotto lo schema di distribuzione dei tessuti per ciascun individuo, ad ogni parte del corpo è stato attribuito un valore numerico variabile da 1 a 5 in funzione della percentuale di distribuzione di tessuto maschile presente, stimando una media di distribuzione tra lo schema della vista dorsale e quello della vista ventrale (per quanto riguarda le ali e le zampe, la media è stata effettuata confrontando le distribuzioni tra la parte destra e quella sinistra).

Le classi di mascolinità individuate sono indicate in tabella 2.4, mentre uno schema esemplificativo dell'attribuzione dei valori di mascolinità è riportato in figura 2.6.

Mascolinità (percentuale di tessuto maschile nella regione del corpo)	Classe
0-20 %	1
21-40 %	2
41-60 %	3
61-80 %	4
81-100 %	5

**Tab. 2.4** – Classi di mascolinità attribuite a ciascuna regione del corpo per individui ginandromorfi di *D.pini*. Percentuali di distribuzione di tessuto maschile stimate dagli schemi prodotti per ciascun esemplare (media tra vista dorsale e ventrale).



**Fig 2.5** – Assegnazione delle classi di mascolinità in base allo schema di distribuzione dei tessuti maschili, femminili e a mosaico degli individui esaminati per ciascuna regione del corpo. Testa: completamente femminile (0% tessuto maschile)= classe 1; torace: per metà femminile e metà a mosaico (dorsalmente), per metà maschile e metà a mosaico (ventralmente) (50% tessuto maschile)= classe 3; addome e genitali esterni completamente maschili = classe 5; ali sinistre maschili, ali destre femminili (50% tessuto maschile)= classe 3; zampe completamente maschili = classe 5.

## 2.4 – ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

L'analisi statistica dei dati ottenuta è stata effettuata mediante il programma di elaborazione dei dati GraphPad (Radusher, 2004).

E' stato utilizzato il test del chi-quadrato per determinare eventuali differenze significative tra le frequenze di sfarfallamento degli individui ginandromorfi, sia per quanto riguarda il confronto tra le linee di allevamento, sia per quanto concerne le eventuali differenze fra le generazioni. Il test è stato eseguito in tabelle di contingenza 8X2 (Totale ginandromorfi e ginandromorfi Allevamento), 7X2 (ginandromorfi Mix), 3X2 (ginandromorfi Velturmo e confronto tra linee) e tabelle 2X2 per determinare le differenze significative tra le linee di allevamento e nelle frequenze totali di sfarfallamento. E' stato invece utilizzato il test esatto di Fisher per confrontare le frequenze di ginandromorfi durante il susseguirsi delle generazioni nella linea Mista.

Nel caso di confronti tra le medie di due popolazioni (confronto dei pesi fra maschi anfionici e partenogenetici nelle linee di allevamento) è stato utilizzato il t-test, mentre per confrontare tre o più gruppi si è ricorso all'analisi della varianza ad una via (ANOVA) per varianze omogenee (nel caso del confronto dei pesi alla sfarfallamento dei ginandromorfi tra le linee di allevamento), o al test non parametrico di Kruscall-Wallis per varianze non omogenee (confronto tra maschi anfionici e partenogenetici tra le linee di allevamento, confronto dei pesi delle femmine).

L'omogeneità delle varianze è stata saggiata mediante il test di Bartlett, mentre nel caso di differenze significative le medie sono state analizzate mediante il test di Tukey per quanto riguarda l'ANOVA e tramite il test di Dunns per statistiche non parametriche.

## 2.5 – STUDIO DEL CAROTIPO IN *D. PINI*

E' stata condotta un'analisi sul cariotipo di *D.pini* in quanto le notizie reperibili in bibliografia su questo argomento erano contrastanti.

Beaudoin *et al.* (1994) riportano un numero cromosomico di  $n=7$  (maschi) e  $2n=14$  (femmine) per questa specie, mentre in un lavoro successivo Rousselet *et al.* (1998) dimostrano che in realtà il numero di cromosomi è  $n=14$  (maschi) e  $2n=28$  (femmine).



La ricerca è stata condotta per tentare di individuare la eventuale presenza di maschi diploidi prodotti in seno all'allevamento, ipotesi proposta da Beaudoin e colleghi ma mai dimostrata attraverso l'analisi kariologica degli individui. Il ritrovamento di maschi con ploidia anomala potrebbe aiutarci a comprendere meglio anche il meccanismo originante gli individui ginandromorfi, in quanto la determinazione del sesso in questi insetti dipende appunto dal livello di ploidia delle cellule che formano i differenti tessuti.

Per approntare i preparati è stata seguita la tecnica di preparazione di cromosomi metafasici proposta da Imai *et al.* (1988) con alcune modifiche, utilizzando testicoli e ovari dissezionati da pupe in via di sviluppo; i vetrini sono stati poi osservati al microscopio in contrasto di fase con un ingrandimento di 1000X. I reagenti utilizzati e la loro composizione sono indicati in tabella 2.4.

- Dissezione degli organi: Per ottenere i preparati kariologici venivano impiegate pupe in uno stadio di sviluppo precoce, quando cioè gli occhi composti delle pupe presentano una colorazione rosso-bruno ma non è ancora iniziato il processo di sclerificazione delle mandibole o del tegumento: è infatti questo il momento dello sviluppo pupale in cui è più facile ottenere preparati di buona qualità. I bozzoli venivano aperti mediante l'ausilio di un bisturi e gli esemplari estratti con pinzette entomologiche; in seguito, gli individui venivano anestetizzati mediante l'utilizzo di basse temperature (10 minuti a 4°C) o mediante l'utilizzo di batuffoli di cotone imbevuti di cloroformio officinale. Dall'addome di ciascun individuo (maschio o femmina) venivano poi dissezionati i genitali in soluzione fisiologica all'interno di un vetrino con cavità.
- Trattamento ipotonico: Dopo aver pulito gli organi da eventuali residui di corpo grasso, questi venivano posti in eppendorf contenenti una soluzione ipotonica di colchicina per circa un'ora.
- Fissazione: In seguito gli organi venivano posti su un vetrino pulito, alcune gocce di fissativo I venivano aggiunte e gli organi erano rapidamente macerati mediante l'ausilio di due paia di pinzette. Prima dell'evaporazione totale del fissativo I venivano addizionate due gocce di fissativo II e quindi, mentre il secondo fissativo cominciava ad evaporare, veniva aggiunto il fissativo III. I vetrini così preparati erano poi lasciati asciugare all'aria per almeno una notte.
- Colorazione e preparazione dei vetrini: Successivamente si provvedeva alla colorazione con una soluzione di Giemsa al 10% per circa 10 minuti. I vetrini erano

infine sciacquati con acqua corrente per circa 20 secondi e lasciati asciugare completamente all'aria per almeno una notte. In seguito si provvedeva al montaggio dei vetrini mediante l'utilizzo di DPX (Sigma-Aldrich ®).

Reagente	Tipo	Composizione
<b>Soluzione Fisiologica</b>	Soluzione Fisiologica	NaCl 0,99 g, KCl 0,02 g, CaCl <sub>2</sub> 0,02 g, Acqua distillata 100 ml.
<b>Colchicina ipotonica</b>	Colchicina ipotonica 0,01%	Colchicina 1 mg, acqua distillata 10 ml.
<b>Fissativo I</b>	1:1 Acido acetico-Etanolo (60%)	Acido acetico glaciale 3 ml, Etanolo 3ml, Acqua distillata 4 ml.
<b>Fissativo II</b>	1:1 Acido acetico-Etanolo (100%)	Acido acetico glaciale 3 ml Etanolo 3 ml.
<b>Fissativo III</b>	Acido acetico glaciale	Tal quale.
<b>Buffer di Sørensen</b>	Buffer Fosfato	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,75 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,5 g, Acqua distillata 1000 ml, pH 6,8.
<b>Colorante</b>	Giemsa 10% in buffer fosfato	Colorante Giemsa in polvere 1,9 g, metanolo 125 ml, glicerina 125 ml.

**Tab. 2.4** – Composizione dei reagenti utilizzati per la preparazione dei cromosomi metafasici. Il colorante di Giemsa è stato preparato dissolvendo 1,9 g di polvere in 125 ml di metanolo. In seguito la soluzione è stata scaldata fino alla temperatura di 60°C aggiungendo 125 ml di glicerina. La soluzione così ottenuta veniva poi filtrata prima dell'uso.

## 2.6 – DETERMINAZIONE DELLO STATO DI INSEMINAZIONE DELLE FEMMINE

Al fine di verificare con esattezza l'avvenuta inseminazione delle femmine, al termine dell'ovideposizione le spermateche utilizzate per la riproduzione sono state dissezionate in soluzione fisiologica e poste su un vetrino portaoggetti.

In seguito queste venivano schiacciate mediante l'ausilio di un vetrino copri oggetto in modo da liberare gli eventuali spermatozoi presenti all'interno. I vetrini così ottenuti sono stati poi immediatamente osservati al microscopio con un ingrandimento pari a 400X, al fine di individuare la presenza di spermatozoi e determinare dunque l'avvenuta inseminazione della femmina, analogamente a quanto descritto per zanzare del genere *Anopheles* (Howell *et al.*, 2003) (Fig. 2.6).

Questa semplice metodologia si è rivelata un utile strumento nell'ambito dell'allevamento controllato di *D. pini*. Tramite questa metodica infatti, è stato possibile confermare precocemente il successo dell'inincrocio all'interno degli schemi sperimentali

di accoppiamento. In questo modo è stato possibile ridurre il numero di ripetizioni effettuate conoscendo anticipatamente se le colonie prodotte fossero o meno partenogenetiche, rendendo più veloce e snella la routine di mantenimento delle linee di allevamento. Inoltre, eventuali anomalie riscontrate nelle generazioni successivamente prodotte (sex ratio inattesa, ginandromorfi sfarfallati) possono essere ricondotte a questo dato, permettendo una migliore comprensione dell'originarsi di questi fenomeni.

Le ripetizioni per le quali lo stato dell'inseminazione è stato verificato sono indicate in Appendice (riquadri relativi agli accoppiamenti colorati in verde e giallo).



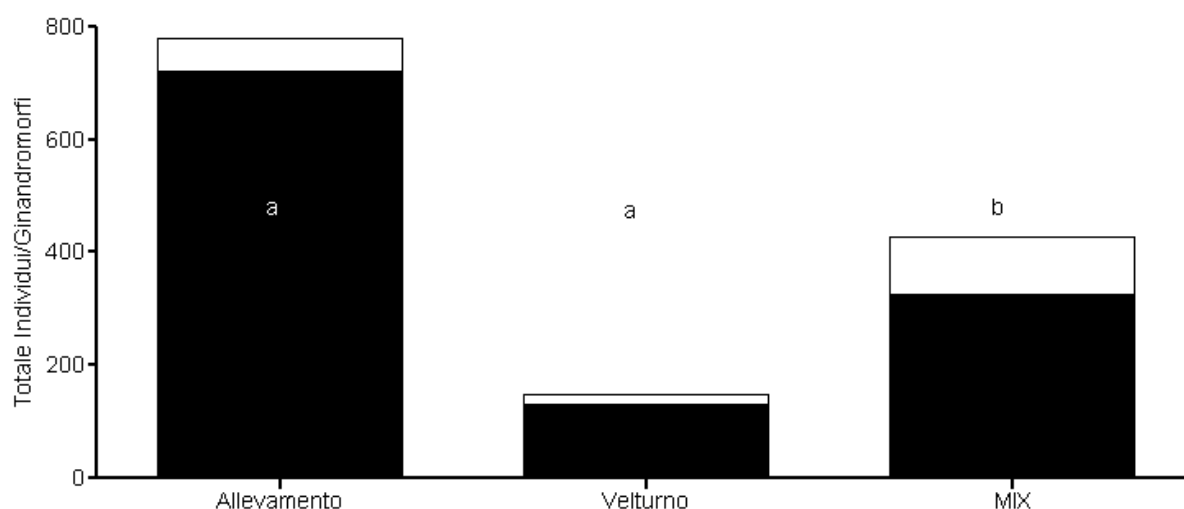
**Fig. 2.6** – Spermateca dissezionata dall'addome di una femmina (a), spermatozoi (indicati dalle frecce nere) (b), particolare di uno spermatozoo (c).

### 3 – RISULTATI

#### 3.1 – PRODUZIONE DI GINANDROMORFI NELL'ALLEVAMENTO CONTROLLATO DI *D.PINI*

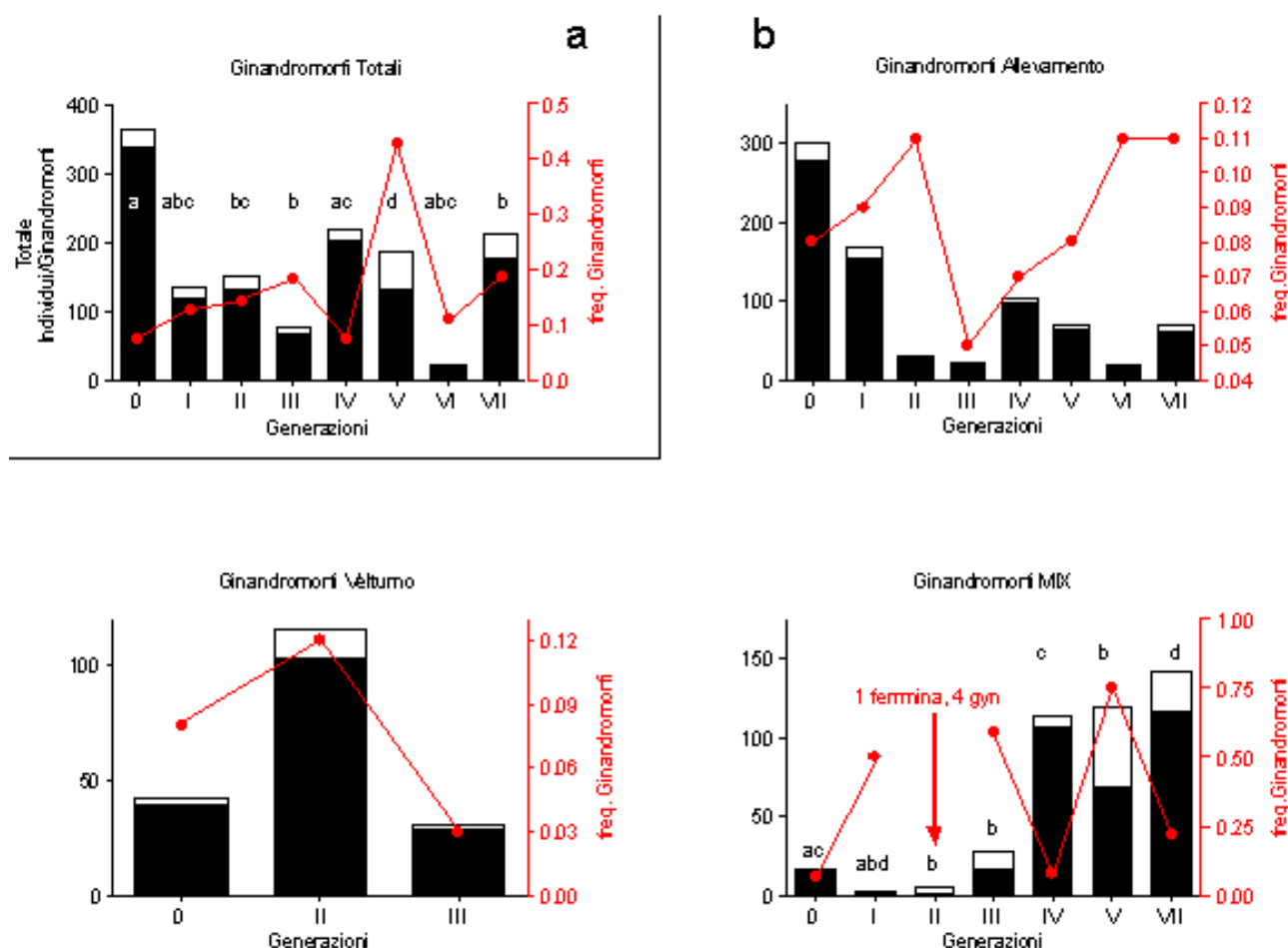
Per quanto riguarda la frequenza di comparsa di ginandromorfi all'interno delle linee sperimentali, gli individui della linea "Mista" hanno prodotto un numero significativamente maggiore di ginandromorfi rispetto alle altre due linee di allevamento, mentre non ci sono differenze significative nelle frequenze di ginandromorfi tra le linee "Allevamento" e "Velturmo" (Fig. 3.1). Durante le prove sperimentali sono stati osservati 177 esemplari ginandromorfi prodotti in seno all'allevamento controllato di *D.pini* (Allevamento: 60 esemplari, Velturmo: 16, Mista: 101).

Linea	Ginandromorfi	Normali (M+F)	Frequenza
Allevamento	60	719	0,08
Velturmo	16	132	0,12
Mista	101	325	0,31
Totale	177	1176	0,15



**Fig 3.1** – Totale degli individui ginandromorfi osservati nelle linee di allevamento prodotte. In nero, individui normali (maschi + femmine). In bianco, individui ginandromorfi. Lettere diverse indicano differenze significative. Test del chi-quadrato in tabella di contingenza 3X2 ( $\chi^2 = 62,81$ , 2 g.l.). Le differenze significative tra linee sono state calcolate tramite tabelle di contingenza 2X2.

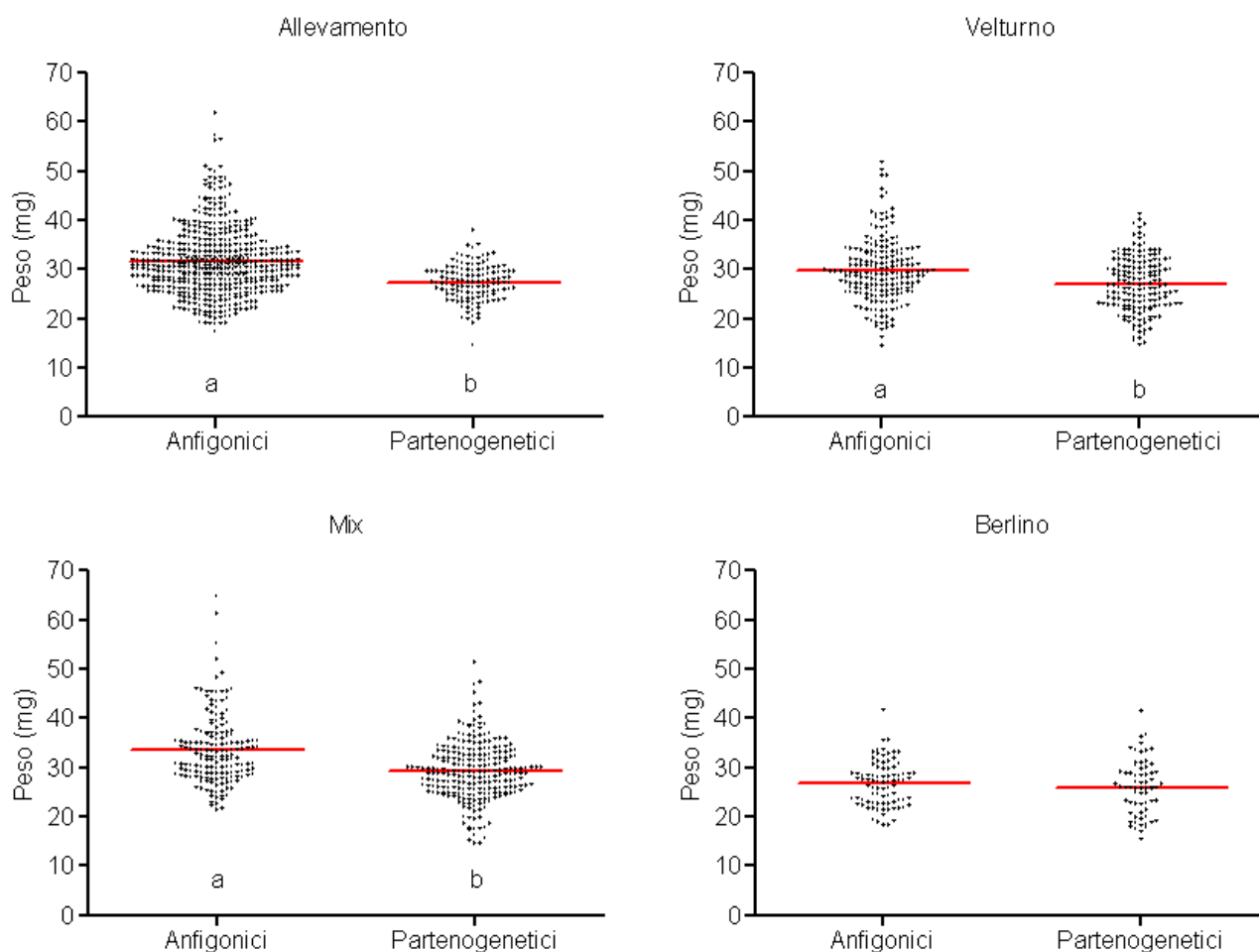
Sono stati analizzati i dati relativi alle frequenze di ginandromorfi durante il susseguirsi delle generazioni nelle tre diverse linee di allevamento per evidenziare eventuali differenze di frequenza tra una generazione e l'altra. Anche in questo caso, le differenze significative hanno riguardato unicamente la linea "Mista", mentre le differenze riscontrate nelle linee "Allevamento" e "Velturmo" non sono risultate essere significative (Fig. 3.2).



**Fig 3.2** – Ginandromorfi prodotti nel susseguirsi delle generazioni. Totale (a), e per ciascuna linea di allevamento (b). In nero, individui normali. In bianco, ginandromorfi. In rosso, andamento delle frequenze di ginandromorfi nelle generazioni, lettere diverse indicano differenze significative. Test del chi-quadrato in tabella di contingenza 8X2 (ginandromorfi totali,  $\chi^2= 68,82$ , 7 g.l.; ginandromorfi allevamento,  $\chi^2= 1,60$ , 7 g.l.), 3X2 (ginandromorfi Velturmo  $\chi^2= 1,67$ , 2 g.l.) e 7X2 (ginandromorfi Mix,  $\chi^2= 58,23$ , 6 g.l.). Le differenze significative tra generazioni sono state calcolate tramite test di Fisher in tabelle di contingenza 2X2.

### 3.2 – ANALISI DEI PESI ALLO SFARFALLAMENTO DEGLI ADULTI

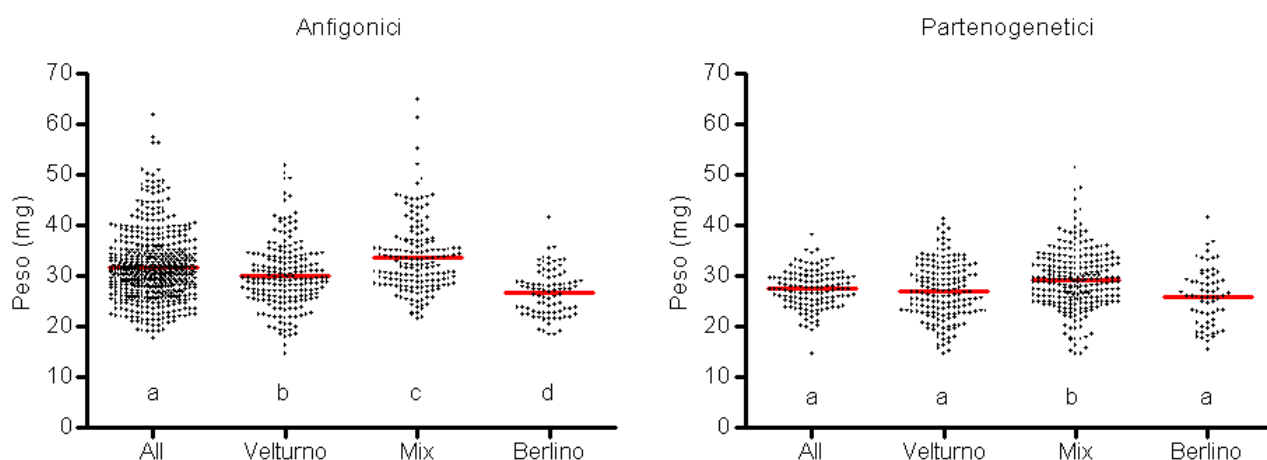
Sono stati confrontati i pesi allo sfarfallamento dei maschi ottenuti per partenogenesi e per anfigonia nelle diverse linee di allevamento; i risultati sono riportati in figura 3.3.



**Fig. 3.3** – Confronto fra i pesi dei maschi adulti ottenuti per riproduzione anfigonica e per partenogenesi nelle linee di allevamento. Le linee rosse indicano il peso medio della popolazione, ogni punto rappresenta una misurazione. E' stato effettuato un t-test per evidenziare differenze significative tra le due popolazioni di ciascuna linea di allevamento, lettere diverse indicano differenze significative.

Nelle linee di allevamento sottoposte ad inincrocio sin dal 2007 (Allevamento, Velturmo e Mista) esiste una differenza significativa tra i pesi degli individui ottenuti per riproduzione anfigonica rispetto a quelli ottenuti per partenogenesi: i primi sono risultati essere più pesanti dei secondi. Nessuna differenza significativa è invece stata rilevata tra gli individui anfigonici e partenogenetici appartenenti alla linea “Berlino”.

Sono poi stati confrontati tra loro i pesi dei maschi di ciascuna linea per evidenziare differenze significative all'interno dei gruppi ottenuti per partenogenesi e per anfigonia, i risultati sono schematizzati in figura 3.4.

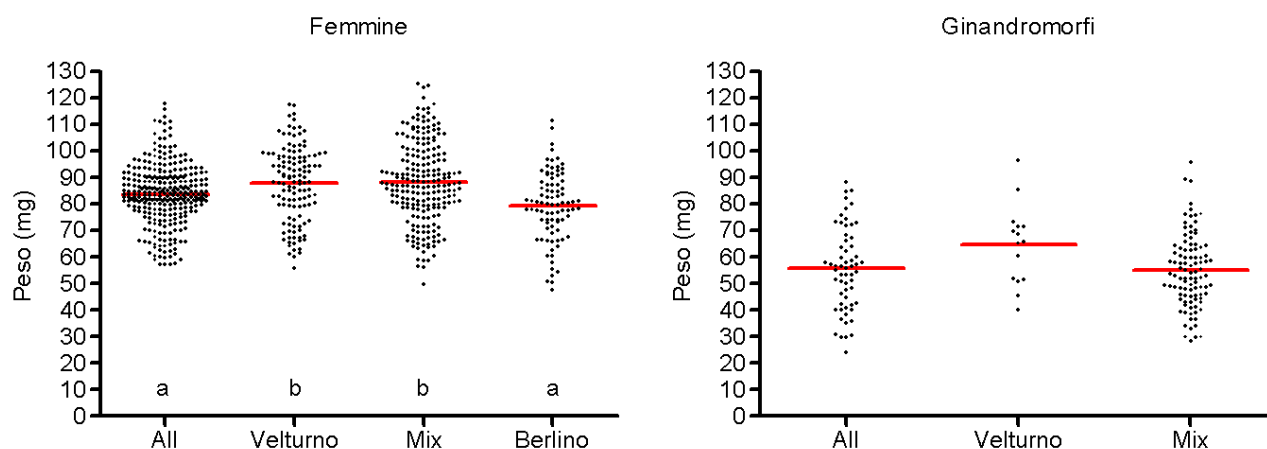


**Fig. 3.4** – Confronto fra i pesi dei maschi adulti delle diverse linee ottenuti per riproduzione anfigonica e per partenogenesi. Le linee rosse indicano il peso medio della popolazione, ogni punto rappresenta una misurazione. Test non parametrico di Kruskal-Wallis, lettere diverse indicano differenze significative.

In questo caso sussiste una differenza significativa tra tutti gli individui ottenuti per anfigonia, i maschi della linea “Mista” sono risultati mediamente i più pesanti, mentre quelli della linea “Berlino” i più leggeri.

Nell'ambito dei maschi ottenuti partenogeneticamente invece, solamente gli esemplari della linea “Mista” sono risultati significativamente più pesanti rispetto a quelli delle altre tre linee saggiate.

Analogamente, anche i pesi delle femmine e dei ginandromorfi sono stati confrontati, i risultati sono illustrati in figura 3.5.

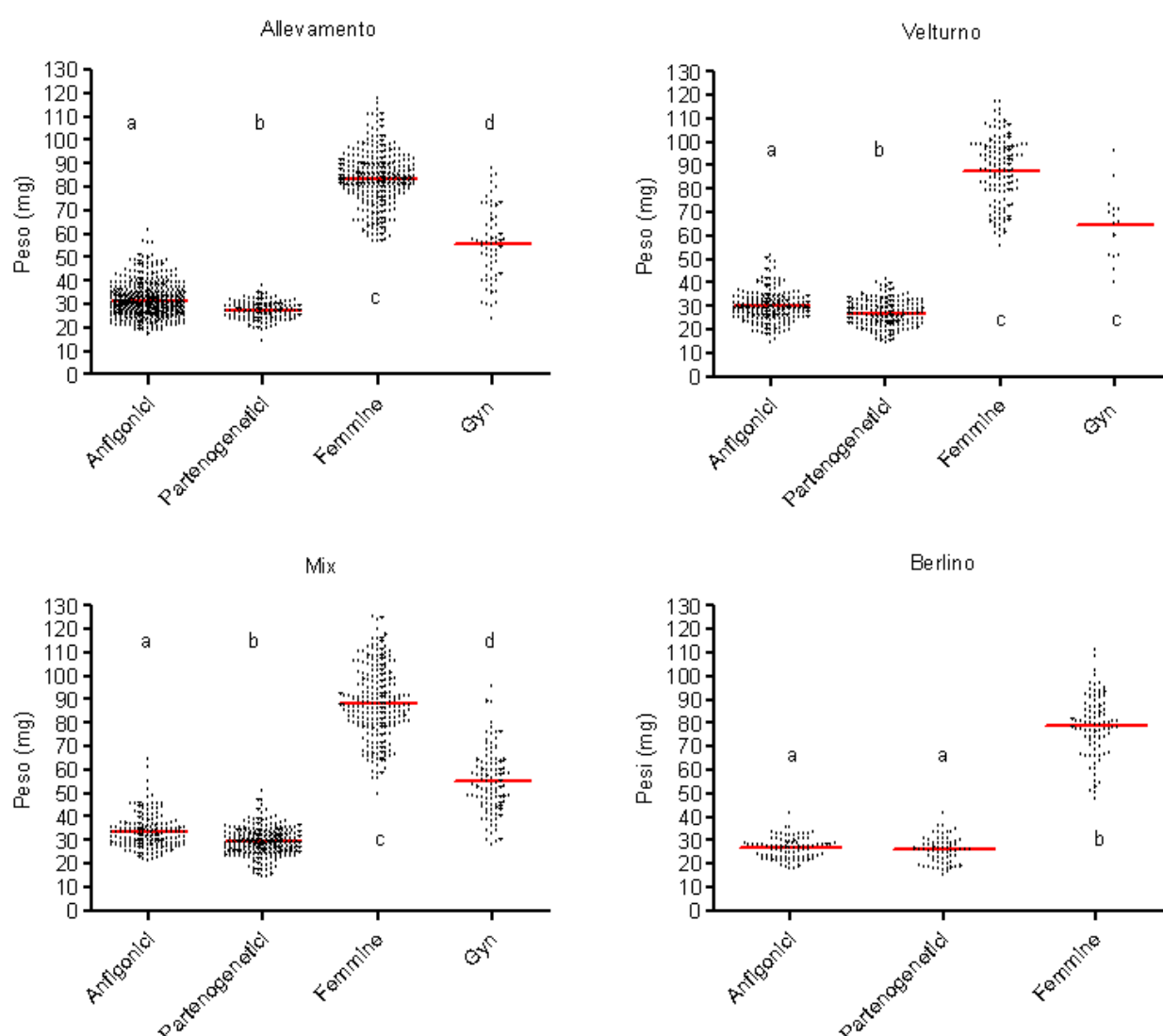


**Fig 3.5** – Confronto fra i pesi delle femmine adulte (a sinistra) e dei ginandromorfi (a destra) nelle diverse linee. Le linee rosse indicano il peso medio della popolazione, ogni punto rappresenta una misurazione. Test non parametrico di Kruskal-Wallis (Femmine) e analisi della varianza a una via (ginandromorfi), lettere diverse indicano differenze significative.

L'analisi dei pesi alla sfarfallamento delle femmine indica che gli individui delle linee "Velturmo" e "Mista" sono significativamente più pesanti rispetto a quelle delle linee "Allevamento" e "Berlino"; tra queste ultime invece, non ci sono differenze significative.

L'analisi statistica dei pesi degli individui ginandromorfi invece, non mostra differenze significative tra le linee di allevamento.

Infine, in figura 3.6 viene riportato il confronto tra tutte le tipologie di adulti ottenuti (maschi anfigonici, maschi partenogenetici, femmine e ginandromorfi) nelle diverse linee di allevamento.



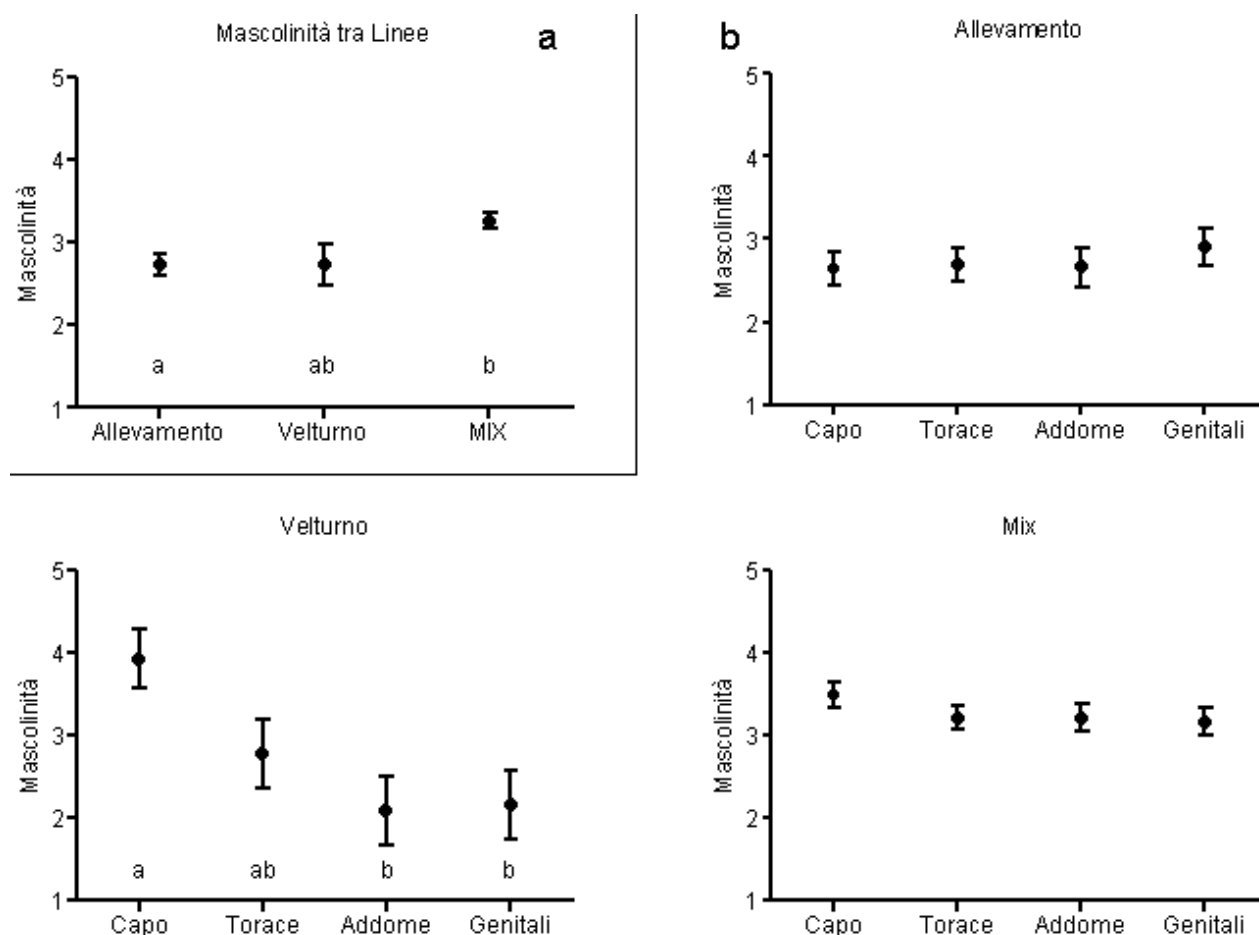
**Fig 3.6** – Confronto tra i maschi anfigonici, maschi partenogenetici, femmine e ginandromorfi in ciascuna linea di allevamento. Le linee rosse indicano il peso medio della popolazione, ogni punto rappresenta una misurazione. Test non parametrico di Kruskal-Wallis, lettere diverse indicano differenze significative.



### 3.3 – STUDIO DELLA MASCOLINITÀ DEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI

Sulla base degli schemi creati per gli individui ginandromorfi, è stata condotta un'indagine sulla mascolinità manifestata dagli esemplari anomali (cfr. par. 2.4), in modo da determinare se il fenomeno presentasse una certa polarità, come ipotizzato da alcuni autori (Martini *et al.*, 1999; Kamping *et al.*, 2007).

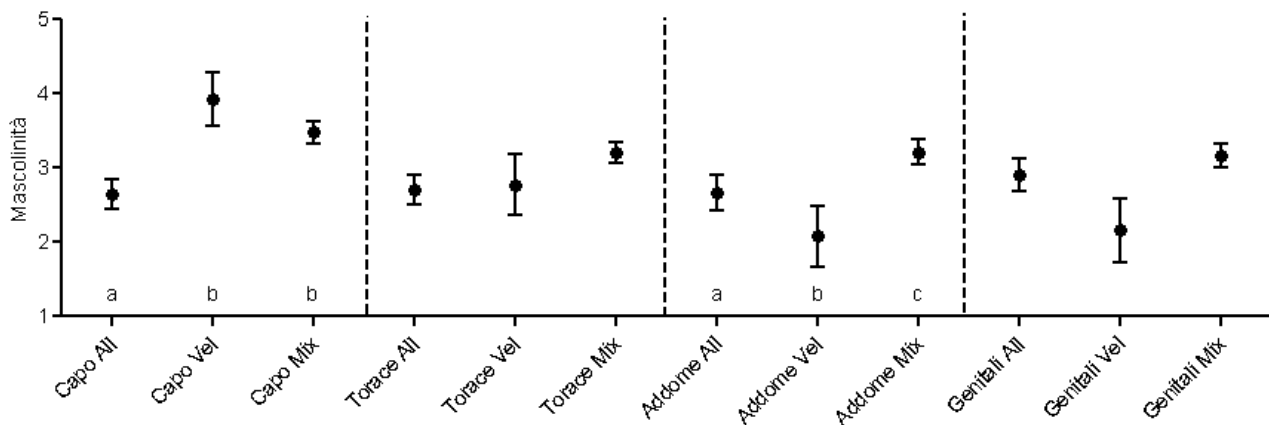
I risultati relativi al confronto tra la mascolinità totale media dei ginandromorfi ottenuti nelle tre linee di allevamento e quello relativo alle diverse regioni corporee in ciascuna linea sono riassunti in figura 3.7.



**Fig. 3.7** – Confronto tra i valori di mascolinità media di individui ginandromorfi nelle tre linee di allevamento (a) e nelle diverse regioni del corpo (capo, torace, addome e genitali esterni) per ciascuna linea di allevamento (b). Valori medi  $\pm$  errore standard. Analisi della varianza a una via (ANOVA). Lettere diverse indicano differenze significative.

L'analisi della varianza evidenzia una differenza significativa di mascolinità media tra le linee "Allevamento" e "Mista", laddove i ginandromorfi di quest'ultima presentano un indice di mascolinità maggiore, indicando quindi una percentuale maggiore di distribuzione di tessuti maschili rispetto a quelli femminili. La mascolinità media dei ginandromorfi della linea "Velturmo" invece, non è significativamente diversa da quella delle altre due linee.

Per quanto riguarda il confronto tra le differenti regioni del corpo nelle tre linee di individui, le uniche differenze significative rilevate sono a carico degli individui della linea "Velturmo": questi presentano un valore di mascolinità maggiore nella regione del capo e minore in quella dell'addome (e dei genitali esterni), mentre il torace mostra caratteristiche intermedie. In questa linea quindi, sembra manifestarsi una certa polarità cefalo-caudale (o antero-posteriore), in cui i caratteri maschili sono espressi preferenzialmente nella regione della testa, in accordo con quanto riportato in altri studi simili. Il confronto tra i segmenti corporei nelle altre due linee invece non ha mostrato differenze significative, ma per tutte le regioni analizzate degli individui di "Allevamento" il valore medio è stato  $<3$  (indicando una prevalenza di tessuto femminile sul soma degli individui), mentre per quanto riguarda la linea "Mista" si è verificato l'opposto, con un valore medio  $>3$  per tutte le parti del corpo (e quindi una prevalenza di tessuti maschili).



**Fig. 3.8** – Confronto tra le linee per ogni singola parte del corpo. Valori medi  $\pm$  errore standard. Analisi della varianza a una via (ANOVA). Lettere diverse indicano differenze significative.

Dal confronto delle tre linee che hanno prodotto individui ginandromorfi per ogni singola parte del corpo, si può notare che le differenze significative riguardano unicamente le regioni della testa e dell'addome.

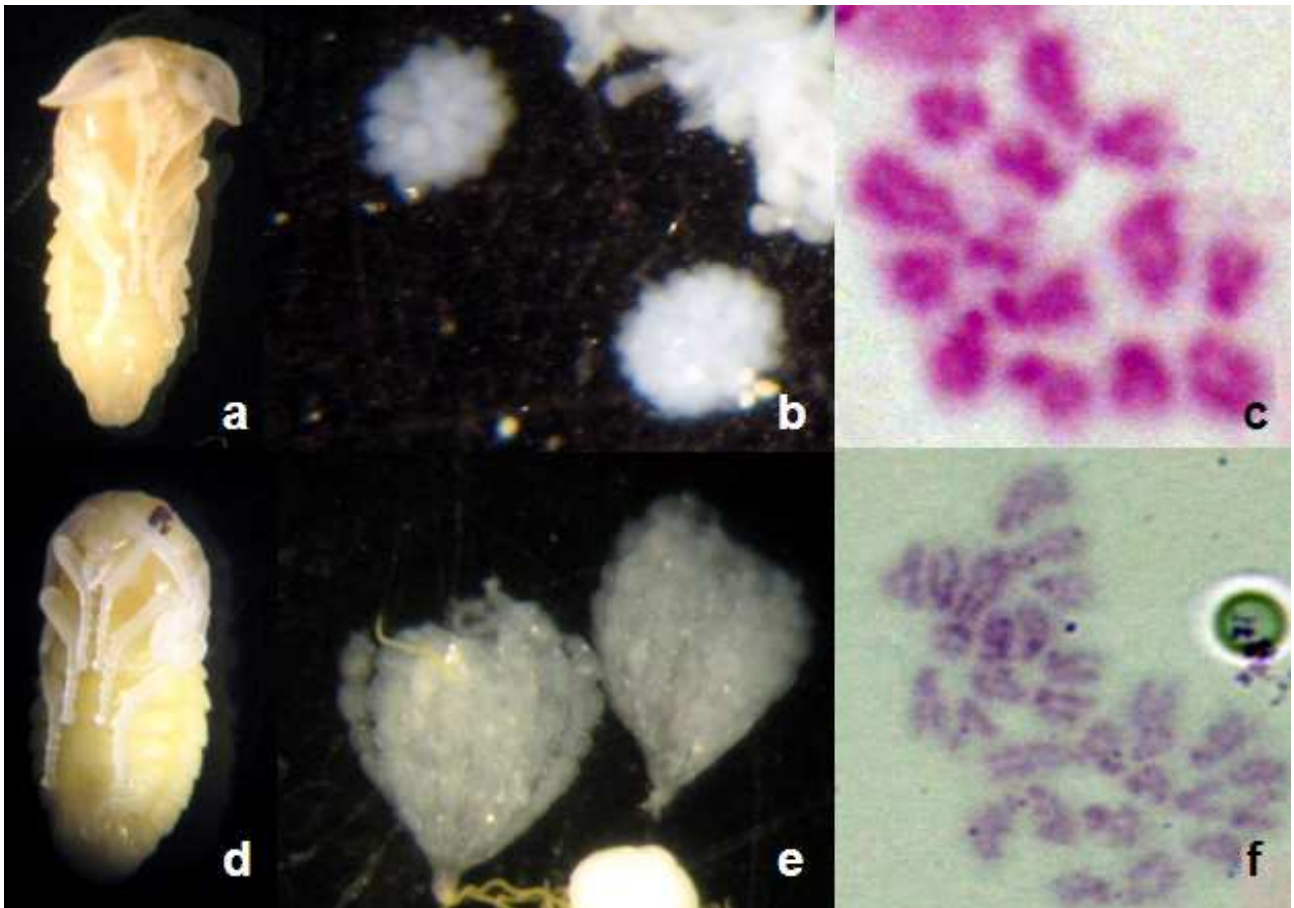
Nel primo caso i dati relativi agli esemplari della linea di Allevamento risultano significativamente meno mascolinizzati rispetto a quelli delle altre due linee, mentre per quanto riguarda l'addome i dati sono significativamente diversi per ciascuna linea di allevamento, e per questa regione corporea gli individui della linea di Velturmo risultano i meno mascolinizzati.

### **3.4 – STUDIO DEL CARIOTIPO IN *D. PINI***

I risultati dell'analisi kariologica su pupe maschili e femminili di *D. pini* sono riassunti in figura 3.9.

In accordo con quanto pubblicato da Rousselet *et al.* (1998), l'insetto presenta un cariotipo aploide maschile con  $n = 14$  e un cariotipo diploide femminile di  $n = 28$  cromosomi.

Durante la sperimentazione sono stati sottoposti ad analisi 29 esemplari (14 femmine e 15 maschi), ma non sono stati rilevati individui con una ploidia anomala (maschi diploidi); nessun individuo ginandromorfo è stato saggiato per il numero cromosomico.



**Fig 3.9** – Studio del cariotipo di *D.pini*. Pupa maschile con gli occhi composti rosso-bruni(a), testicoli dissezionati (b) corredo maschile aploide ( $n=14$ ) (c), pupa femminile con gli occhi composti rosso-bruni (d) ovari dissezionati (e), corredo femminile diploide ( $2n=28$ )(f).

## 4 – DISCUSSIONE

### 4.1 – PRODUZIONE DI GINANDROMORFI IN RELAZIONE AL GRADO DI ININCROCIO

Dai risultati ottenuti la produzione di ginandromorfi all'interno delle linee di allevamento create non sembra dipendere dal grado di inincrocio degli individui. Infatti, la linea che ha prodotto una quota significativamente più elevata di ginandromorfi è stata la linea Mista, con una frequenza media di sfarfallamento nelle ripetizioni prese in esame di 0,31 (linea Allevamento = 0,08; linea Velturmo = 0,12). Inoltre, nessuna differenza significativa è stata rilevata tra le varie generazioni nelle linee di Allevamento e di Velturmo, indicando che il fenomeno non si manifesta con maggiore frequenza nelle linee più pesantemente soggette ad inbreeding (le due linee citate sono state mantenute isolate per tutta la durata della sperimentazione, a differenza della linea Mista che è stata continuamente rinsanguata - cfr. Appendice).

Il fenomeno sembra anche manifestarsi in modo costante senza oscillazioni di frequenza nelle popolazioni da più tempo soggette ad inincrocio: questa evidenza, unitamente all'elevata frequenza con cui si è manifestato il fenomeno (177 ginandromorfi e 1176 individui normali, frequenza = 0,15) fa propendere per un'origine determinata da fattori genetici piuttosto che da anomalie e aberrazioni dei meccanismi della riproduzione, più casuali e imprevedibili.

Anche l'influenza di fattori ambientali, come la variazione di temperatura di allevamento, fattore determinante per la produzione di ginandromorfi in *O. submetallicus* (Wilson, 1962) e dovute alla presenza di microorganismi simbiotici possono essere escluse (come già sostenuto da Kamping *et al.*, 2007; Stouthamer, 1997), in quanto per tutta la durata della sperimentazione non sono state registrate variazioni termiche significative all'interno della cella di allevamento (cfr. Figura 2.1). Le variazioni di umidità relativa registrate durante la sperimentazione sono invece dovute alla presenza delle bottiglie d'acqua utilizzate durante l'ovideposizione e lo sviluppo embrionale per il mantenimento dei rami di pino.

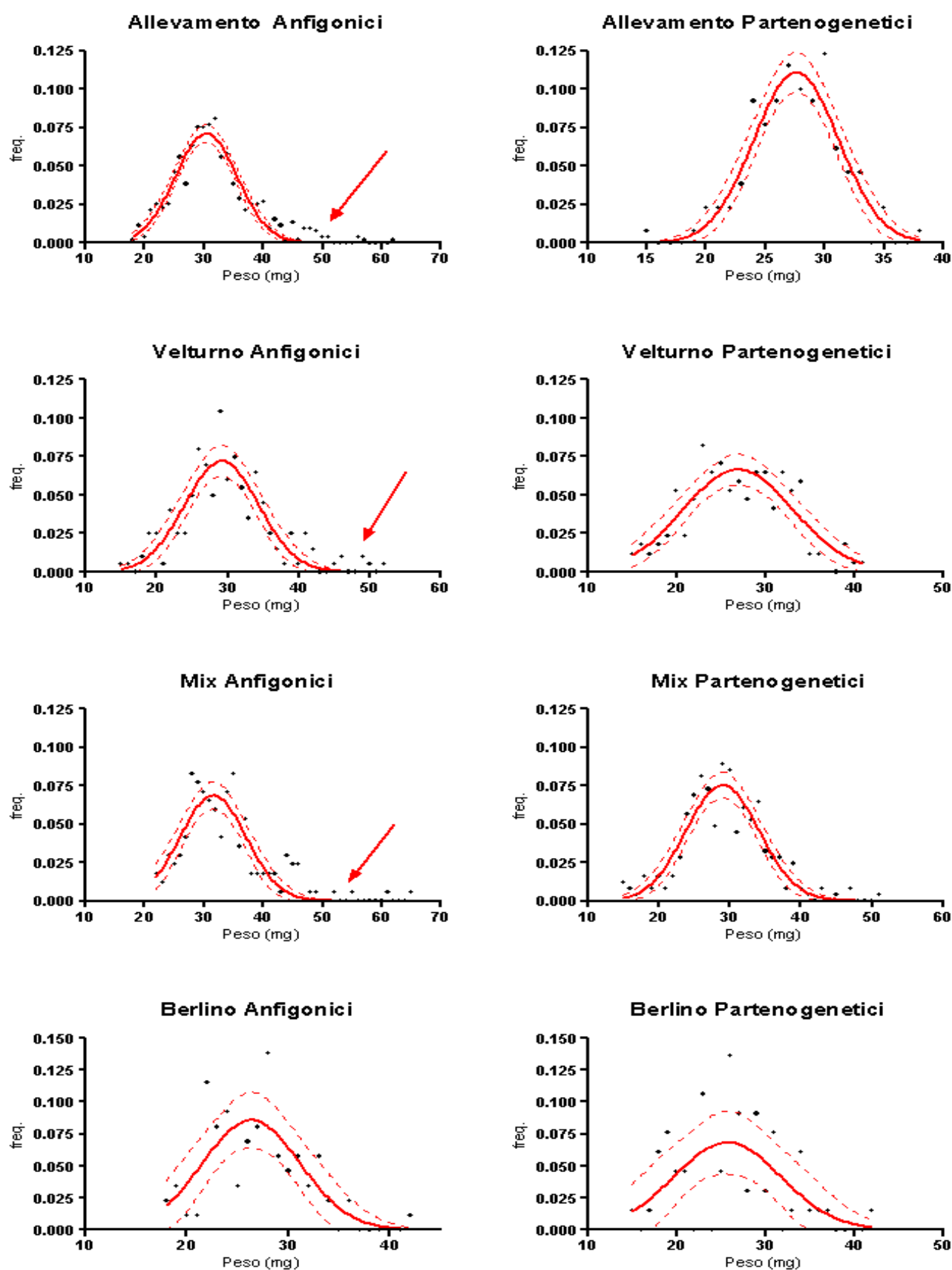
## 4.2 – ANALISI DEI PESI ALLO SFARFALLAMENTO DEGLI ADULTI

L'analisi dei pesi allo sfarfallamento degli adulti ha messo in luce differenze significative nei confronti tra i maschi ottenuti partenogeneticamente (più leggeri) e quelli ottenuti per anfigonia (più pesanti) in tutte le linee saggiate ad eccezione di quella di Berlino (di più recente introduzione). Questi dati sono in accordo con quelli pubblicati da Beaudoin *et al.* (1994), portati come prova per la produzione di maschi diploidi in linee di allevamento soggette ad inincrocio, con la presenza di maschi più pesanti che compaiono con bassa frequenza (Figura 4.1).

Il confronto tra i pesi dei maschi delle diverse linee ottenuti per partenogenesi invece ha evidenziato differenze significative solamente per quanto riguarda i maschi della linea Mista, mentre le linee di Allevamento e Velturmo non si sono rivelate differenti rispetto a quella di Berlino (cfr. Figura 3.4).

Per quanto riguarda le femmine, l'analisi statistica dei pesi indica che non ci sono differenze significative tra le linee "Allevamento" e "Berlino" e tra quelle "Mista" e Velturmo" (Figura 3.5).

L'analisi dei pesi allo sfarfallamento degli esemplari ginandromorfi invece, non ha mostrato differenze significative tra le linee, anche se gli esemplari della linea "Velturmo" sono risultati mediamente più pesanti.

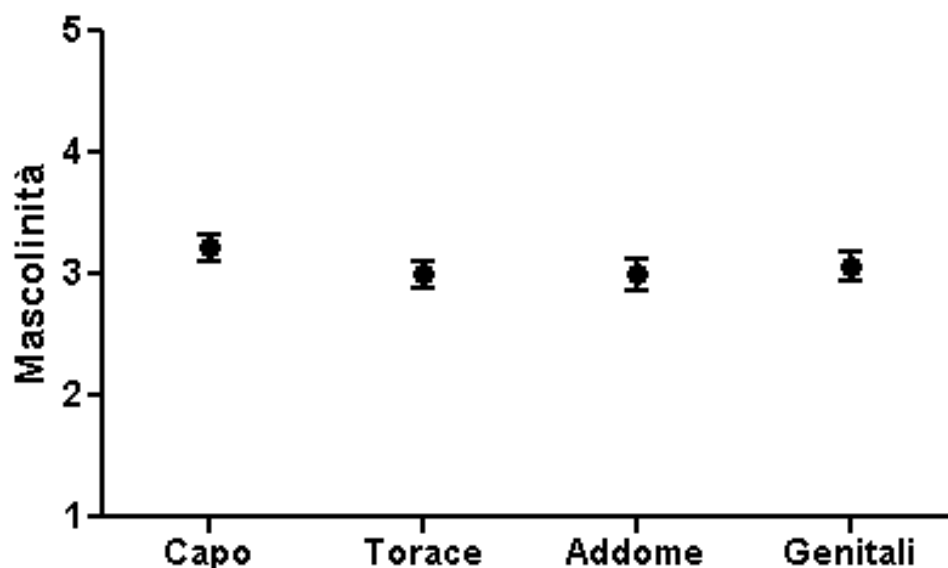


**Fig. 4.1** – Distribuzione delle frequenze dei pesi dei maschi anfigonici (a sinistra) e partenogenetici (a destra) nelle linee di allevamento saggiate. In rosso, distribuzione normale, le linee tratteggiate indicano la intervallo di confidenza (95%). Le frecce rosse indicano frequenze di pesi che non rientrano nelle curve di distribuzione.

### 4.3 – STUDIO DELLA MASCOLINITÀ

L'analisi della varianza della mascolinità negli individui ginandromorfi prodotti ha evidenziato differenze significative tra la linea "Allevamento" e quella "Mista", mentre quella di "Velturmo" non è significativamente diversa dalle altre due.

Il confronto tra la mascolinità delle varie parti del corpo non ha mostrato differenze nelle linee "Allevamento" e "Mista", mentre sembra esistere una polarità antero-posteriore (cefalo-caudale) nei ginandromorfi della linea "Velturmo", in cui la testa risulta essere più mascolinizzata dell'addome, mentre il torace presenta caratteristiche intermedie. Confrontando i valori di mascolinità per i vari segmenti del corpo considerando tutti gli individui prodotti invece, sembra che non sussista alcuna polarizzazione del fenomeno lungo l'asse mediano del corpo degli insetti (Figura 4.2). Questi dati sono in disaccordo con quanto riportato da diversi autori (Kamping *et al.*, 2007), che riportano una polarità antero-posteriore del fenomeno, con individui che presentavano caratteristiche maschili soprattutto nella regione cefalica e femminili in quella caudale.



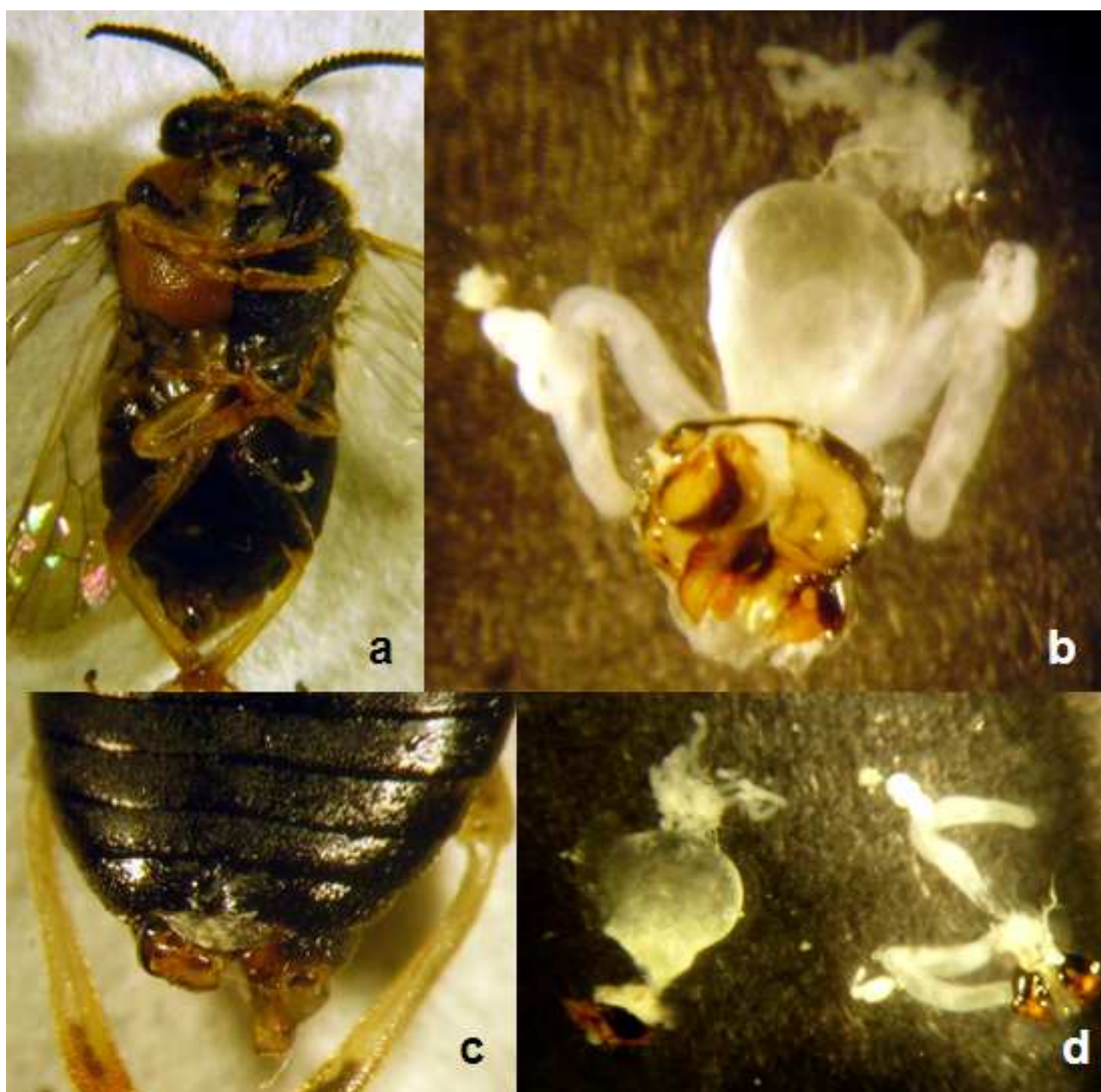
**Fig. 4.2** – Confronto fra i valori di mascolinità nelle regioni del corpo prese in esame calcolata su tutti gli individui prodotti.



L'analisi della distribuzione dei tessuti negli esemplari esaminati ha mostrato, nel suo complesso, un rapporto vicino a 1 tra tessuti maschili e femminili (espresso, in Figura 4.2, come classe 3 di mascolinità in grafico), indicando che probabilmente le anomalie si manifestano durante uno stadio precoce dello sviluppo embrionale dell'insetto (assumendo che il tasso di proliferazione delle cellule aploidi e diploidi sia uguale).

Una ulteriore prova a favore di questa ipotesi è fornita dall'analisi dei genitali interni di un individuo anomalo che presentava genitali esterni di carattere intermedio; l'esemplare presentava testicoli (di origine mesodermica) e spermateca (di origine ectodermica) completamente formati, indicando che l'anomalia avrebbe avuto luogo durante l'embriogenesi prima della differenziazione dei foglietti embrionali.

. I tratti di questo individuo sono riportati in Figura 4.3. Non sono stati documentati fino ad ora altri casi simili: altri individui analizzati non hanno presentato questo tipo di corrispondenza fra genitali esterni ed interni, dal momento che internamente si manifestava un solo tipo di apparato ben formato a fronte di una manifestazione esterna di tipo intermedio.



**Fig. 4.3-** Foto di un individuo ginandromorfo allo stereomicroscopio.. Vista ventrale (a), particolare dei genitali esterni (c), genitali interni (b), particolare della spermateca a sinistra e dei testicoli con dotti deferenti a destra (d).

#### 4.4 – ANALISI DEL CARIOTIPO

L'analisi del cariotipo di *D. pini* ha confermato i dati presentati da Rousselet *et al.* (1998), e non è stato rilevato nessun maschio diploide negli individui osservati.

Non è stato possibile sottoporre nessun individuo ginandromorfo all' analisi cariologica in quanto lo stadio utile (pupa precoce) per la preparazione dei cromosomi

secondo la tecnica utilizzata non consente di identificare con certezza anomalie somatiche negli individui, con eccezion fatta per le antenne (Figura 4.4)



**Fig. 4.4** – Pupa di un individuo ginandromorfo con antenna destra a carattere intermedio (a) e adulto risultante (b).

#### 4.5 – CONCLUSIONI

Dai dati in nostro possesso risulta difficile dare un'interpretazione certa della manifestazione del ginandromorfismo in *Diprion pini*. Il fenomeno non sembra infatti influenzato dall'incrocio per più generazioni tra consanguinei. Al contrario, sembra che le frequenza di comparsa degli individui anomali si stabilizzi nelle linee di allevamento a più alto grado di inbreeding; di contro l'incrocio di due linee precedentemente mantenute isolate ha portato alla produzione di una percentuale significativamente più elevata di ginandromorfi.

Questi dati sembrano mettere in dubbio le ipotesi proposte precedentemente per spiegare l'originarsi del fenomeno (quali la presenza di uova binucleate, la polispermia, riduzione/duplicazione del numero cromosomico o perdita di parte del materiale genetico - cfr. paragrafo 1.1.2), in quanto nelle prove sperimentali effettuate il fenomeno si è manifestato con una frequenza piuttosto elevata (in tutte le linee saggiate in generale, e in quella mista in particolare) e costante (nel caso delle linee maggiormente soggette ad inbreeding, cfr. Figura 3.2); queste condizioni non sono, in linea di principio, compatibili con manifestazioni (quali per l'appunto anomalie o aberrazioni della fecondazione o citologiche) che dovrebbero manifestarsi in via eccezionale e casuale .

Per quanto riguarda la manifestazione somatica del ginandromorfismo, confrontando i valori di mascolinità totali (confrontando i valori di tutti gli individui ottenuti) per i tutti i segmenti del corpo, non sembra sussistere come regola generale una polarità lungo l'asse del corpo degli insetti (nella linea di Velturino l'analisi statistica della mascolinità ha messo in luce una polarità antero- posteriore, con teste mascolinizzate e addomi femminilizzati).

Nonostante non siano stati individuati maschi diploidi tramite le analisi carilogiche effettuate, la loro comparsa all'interno delle linee di allevamento prodotte è fortemente probabile, come dimostrato dall'analisi dei pesi degli individui ottenuti per riproduzione anfignica, analogamente a quanto osservato da Beaudoin *et al.* (1994). La presenza di questi maschi diploidi confermerebbe l'ipotesi che il sesso in questa specie sia determinato secondo il modello del CSD (cfr. paragrafo 1.2), come già osservato da Smith & Wallace (1971) per i Diprionidi *Neodiprion nigroscutum* e *Neodiprion pinetum*.

Lo studio del cariotipo ha confermato che il numero cromosomico aploide di *D. pini* è di 14 cromosomi e quello diploide di 28; secondo studi precedentemente condotti sul cariotipo di altri Diprionidi il numero modale di cromosomi della famiglia sarebbe di 7 per il corredo aploide e 14 per quello diploide (Rousselet *et al.*, 1998). *D. pini* sarebbe quindi una specie derivata che si è originata a causa dell'aumento del numero cromosomico di un progenitore ancestrale.

Smith (1941; 1960) propone due distinte ipotesi per spiegare questo tipo di speciazione negli insetti: la poliploidizzazione e la fissione centrica dei cromosomi. Nel primo caso il numero cromosomico viene raddoppiato tramite duplicazione del corredo genetico (la struttura e la forma dei cromosomi rimane inalterata), mentre nel secondo l'aumento numerico si verifica a causa di una rottura dei cromosomi (solitamente a livello del centromero), dando così origine a cromosomi morfologicamente differenti. Se fosse verificata la prima ipotesi, potremmo ipotizzare che in *D. pini* il fenomeno di poliploidizzazione abbia portato alla comparsa (mediante duplicazione) di un nuovo locus per la determinazione del sesso, e che la determinazione del sesso avverrebbe con il meccanismo del multiple-locus piuttosto che per quello del single-locus (come avviene per *N. nigroscutum* e *N. pinetum*). Mediante l'analisi morfologica dei cromosomi in *D. pini* tuttavia, sembra che l'ipotesi più probabile per spiegare l'aumento del numero cromosomico in questa specie sia quello della fissione centrica, in quanto nei Diprionidi con numero cromosomico aploide = 7 i cromosomi sono metacentrici (con il centromero in posizione mediana), mentre in *D. pini* sono telocentrici (con il centromero spostato verso l'estremità) (cfr. Figura 3.9, Rousselet *et al.*, 2000). Questo meccanismo teoricamente non

porterebbe all'aumento dei loci per la determinazione del sesso a meno che la rottura del cromosoma non avvenga proprio a livello del gene in questione.

L'utilizzo di tecniche molecolari potrebbe aiutare in maniera sostanziale la comprensione di queste complesse manifestazioni; numerosi studi recenti hanno utilizzato la tecnica della citometria di flusso per determinare il grado di ploidia nella totalità dei tessuti degli individui prodotti (Butcher *et al.*, 2000; Aron *et al.*, 2003; Salin *et al.*, 2004). In una recente pubblicazione Beukeboom *et al.* (2007) riporta la comparsa di femmine e ginandromorfi aploidi in *Nasonia vitripennis*, rilevati appunto tramite questa metodologia. E' dunque evidente che risulta difficile interpretare questi complessi fenomeni secondo un unico modello, in quanto i fattori che entrano in gioco sono molteplici, e possono influenzare i meccanismi riproduttivi in maniera differente a seconda dell'organismo preso in esame.

Per quanto riguarda *D. pini*, nonostante la manifestazione del ginandromorfismo in questa specie sia di facile identificazione a causa dello spiccato dimorfismo sessuale, risulta difficoltoso utilizzarlo come modello per analisi di questo genere, in quanto a causa della sua biologia, non è possibile ottenere più di 6 generazioni per anno, e l'allevamento di un numero massiccio di esemplari richiede spazi piuttosto ampi. Il mantenimento di linee di allevamento separate (ciascuna con diverse ripetizioni) inoltre, richiede un consumo di substrato alimentare (rami di pino recisi di fresco) piuttosto importante, rendendo l'allevamento abbastanza costoso in termini di tempo e di denaro.

## 5 – BIBLIOGRAFIA

- Aron, S., De Menten, L. & Van Bockstaele, D.**, 2003. Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants. *Molecular Ecology Notes* 3(3): 471-475.
- Ayabe, T., Hoshiba, H. & Ono, M.**, 2004. Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Chromosome Research* 12(3): 215-223.
- Barre, F., Milsant, F., Palasse, C., Prigent, V., Goussard, F. & Géri, C.**, 2002. Preference and performance of the sawfly *Diprion pini* on host and non-host plants of the genus *Pinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102(3): 229-237.
- Beaudoin, L., Geri, C., Allais, J.P. & Goussard, F.**, 1994. Influence of consanguinity on the sex-ratio and diapause of *Diprion pini* L. (Hym., Diprionidae) populations. *Journal of Applied Entomology* 118: 267-280.
- Beukeboom, L.W., Kamping, A., Louter, M., Pijnacker, L.P., Katju, V., Ferree, P.M. & Werren, J.H.**, 2007. Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Science* 315(5809): 206.
- Beye, M.**, 2004. The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* 26(10): 1131-1139.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M.K., Page, R.E. & Omholt, S.W.**, 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114(4): 419-429.
- Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F. & Hubbard, S.F.**, 2000. Single-locus complementary sex determination in *Diadegma chrysostictos* (Gmelin) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Heredity* 91(2): 104-111.
- Cook, J.M.**, 1993. Experimental tests of sex determination in *Goniozus nephantidis* (Hymenoptera: Bethyridae). *Heredity* 71(2): 130-137.
- Cook, J.M. & Butcher, R.D.J.**, 1999. The transmission and effects of Wolbachia bacteria in parasitoids. *Researches on Population Ecology* 41(1): 15-28.
- Cowan, D.P. & Stahlhut, J.K.**, 2004. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(28): 10374-10379.
- Crozier, R.H.**, 1971. Heterozygosity and Sex Determination in Haplo-Diploidy. *The American Naturalist* 105(945): 399-412.

- Cunha, A.B. & Kerr, W.E.**, 1957. A genetical theory to explain sex determination by arrhenotokous parthenogenesis. *Forma et Functio* 1: 33-36.
- DaCosta, J.M., Spellman, G.M. & Klicka, J.**, 2009. Bilateral Gynandromorphy in a White-ruffed Manakin (*Corapipo altera*). *The Wilson Journal of Ornithology* 119(2): 289-291.
- de Boer, J., Ode, P.J., Rendahl, A.K., Vet, L.E.M., Whitfield, J.B. & Heimpel, G.E.**, 2008. Experimental Support for Multiple Locus Complementary Sex Determination in the Parasitoid *Cotesia vestalis*. *Genetics* in press.
- Dobson, S.L. & Tanouye, M.A.**, 1998. Evidence for a Genomic Imprinting Sex Determination Mechanism in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera; Chalcidoidea). *Genetics* 149(1): 233-242.
- Eichhorn, O.**, 1976. Dauerzucht von *Diprion pini* L. (Hym.: Diprionidae) im Laboratorium unter Berücksichtigung der Fotoperiode. *Journal of Pest Science* 49(3): 38-41.
- Eliescu, G.**, 1932a. Beiträge zur Kenntnis der Morphologie, Anatomie und Biologie von *Lophyrus pini* L. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 19(1): 188-206.
- Eliescu, G.**, 1932b. Beiträge zur Kenntnis der Morphologie, Anatomie und Biologie von *Lophyrus pini* L. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 19(1): 22-67.
- Escherich, K.**, 1942. Hymenoptera und Diptera. Die Forstinsekten Mitteleuropas Parey, Paul, Berlin, 746.
- Espinasse, P.G.**, 1934. Bilateral Gynandromorphism in Feathers. *Nature* 133: 330-330.
- Evans, J.D., Shearman, D.C.A. & Oldroyd, B.P.**, 2004. Molecular basis of sex determination in haplodiploids. *Trends in Ecology & Evolution* 19(1): 1-3.
- Garcia-Bellido, A. & Merriam, J.R.**, 1969. Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *Journal of Experimental Zoology* 170(1): 61-75.
- Geiger, W.**, 1983. Gynandromorphe de *Dicranomyia* (S.Str) *Mitis* (Meigen, 1830) (Diptera Nematocera, Limoniidae) et essai d'interprétation. *Bulletin de la Société Neuchateloise des Sciences Naturelles* 106: 55-60.
- Gemeno, C., Anton, S., Zhu, J.W. & Haynes, K.F.**, 1998. Morphology of the reproductive system and antennal lobes of gynandromorphic and normal black cutworm moths, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera : Noctuidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 27(3): 185-191.
- GenoPro**, 2007. Genopro. 2.0.1.6.
- Geri, C.**, 1988. Incidence de l'alimentation sur le développement et la diapause de *Diprion pini* L. (Hym., Diprionidae). *Journal of Applied Entomology* 106: 451-464.



- Heimpel, G.E. & de Boer, J.G.**, 2008. Sex determination in the Hymenoptera. Annual Review of Entomology 53(1): 209-230.
- Heliövaara, K., Väisänen, R., Varama, M. & Viitsaari, M.**, 1992. Gynandromorphic individuals of *Neodiprion sertifer*. Entomologica Fennica 3(3): 149-153.
- Hoshiba, H., Duchateau, M.J. & Velthuis, H.H.W.**, 1995. Diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera) karyotype analyses of diploid females, diploid males and haploid males. Japanese journal of entomology 63(1): 203-207.
- Howell, P., Wilkins, L. & Sutcliffe, A.**, 2003. Dissecting spermathecae to determine insemination status. Methods in Anopheles Research Manual. Chapter 5, Section 5.8. <http://www.mr4.org/CDCtraininghtml/tabid/1410/Default.aspx>.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W.J. & Crozier, R.H.**, 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. Japanese Journal of Genetics 63: 159-185.
- Kamping, A., Katju, V., Beukeboom, L.W. & Werren, J.H.**, 2007. Inheritance of Gynandromorphism in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. Genetics 175(3): 1321-1333.
- Laugè, G.**, 1985. Sex Determination: genetic and epigenetic factors. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (eds.) Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, Vol. 1 - Embryogenesis and Reproduction. Pergamon Press, Oxford.
- Lillie, F.R.**, 1931. Bilateral gynandromorphism and lateral hemihypertrophy in birds. Science 74(1920): 387-390.
- Manolakou, P., Lavranos, G. & Angelopoulou, R.**, 2006. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. Reproductive Biology and Endocrinology 4(1): 59.
- Martini, A., Baldassarri, N. & Baronio, P.**, 1999. Gynandromorphism and its Manifestation in Diprionid Hymenoptera. Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università degli Studi di Bologna 53: 87-107.
- Moraes, R.H.P.**, 2005. Gynandromorphism in *Periga circumstans* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). Neotropical Entomology 34(4): 699-700.
- Morgan, T.H.**, 1905. An Alternative Interpretation of the Origin of Gynandromorphous Insects. Science 21(538): 632-634.
- Naito, T. & Suzuki, H.**, 1991. Sex Determination in the Sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera): Occurrence of Triploid Males. Journal of Heredity 82(2): 101-104.

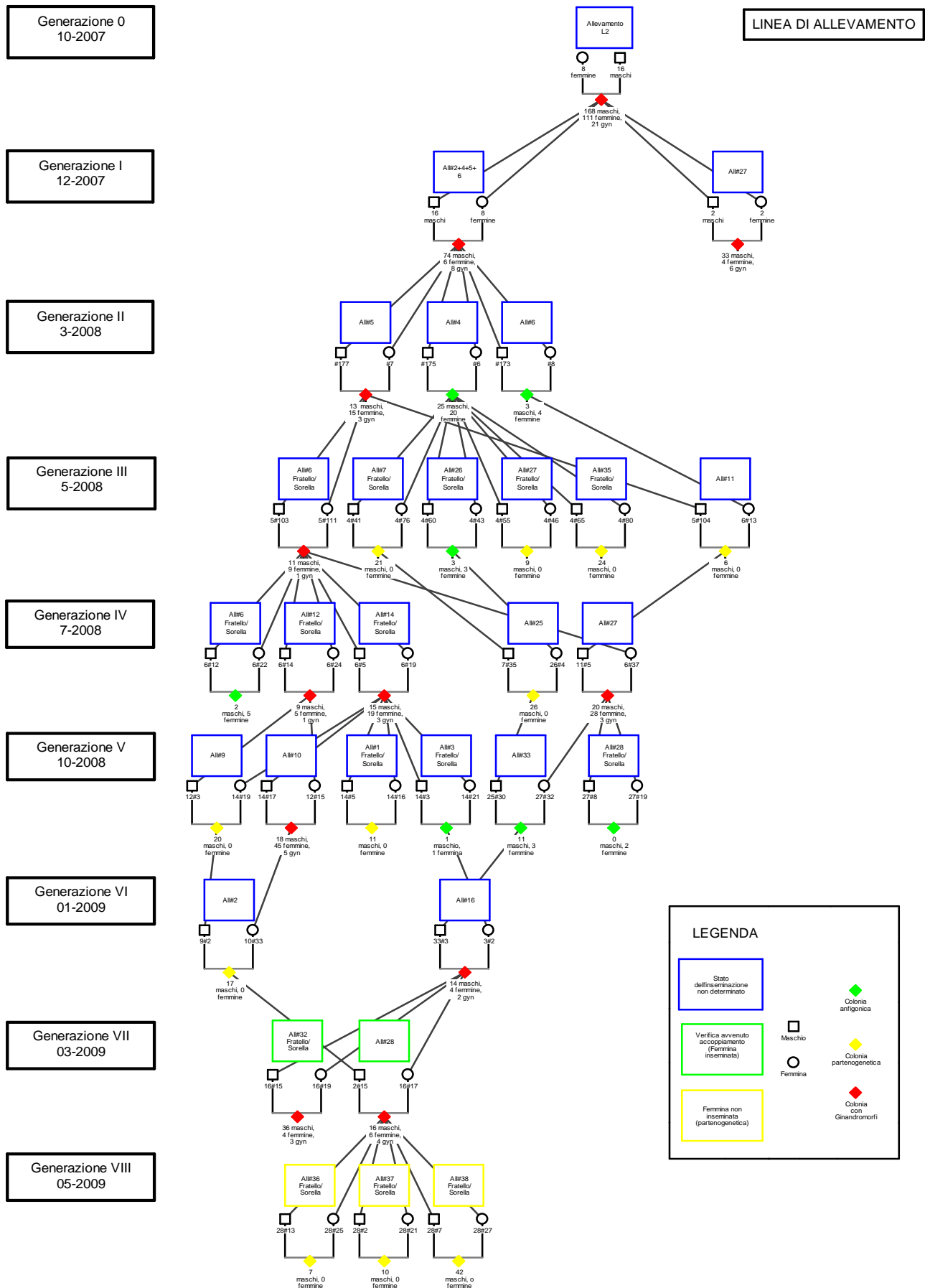
- Narita, S., Nomura, M. & Kageyama, D.,** 2009. A gynandromorph of *Euremia hecabe* (Lepidoptera: Pieridae) from Japan Entomological News 118(2): 134-138.
- Nilsson, G.E.,** 1987. A gynandromorphic specimen of *Evylaeus albipes* (Fabricius) (Hymenoptera, Halictidae) and a discussion of possible causes of gynandromorphism in haplo-diploid insects. Notulae Entomologicae 67: 157-162.
- Olmstead, A.W. & LeBlanc, G.A.,** 2007. The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a Crustacean. International Journal Of Biological Sciences 3(2): 77-84.
- Pener, M.P.,** 1964. Two gynandromorphs of *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera: Acridoidea): morphology and behaviour. Physiological Entomology 39(7-9): 89-100.
- Pereira, R.A.S., Prado, A.P. & Kjellberg, F.,** 2003. Gynandromorphism in pollinating fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). Entomological News 113(3): 152-155.
- Pornbacher, D.,** 1992. Studio biologico e demoecologico su infestazioni di *Diprion pini* (Linnaeus) (Hymenoptera, Diprionidae) in Val Venosta. Facoltà di Agraria Università degli Studi di Padova, Padova.
- Pschorn-Walcher, H.,** 1982. Symphyta, Pflanzenwespen. Tenthredinoidea. In: Parey, P. & W, S. (eds.), Die Forstschädlinge Europas, Hamburg, 392pp.
- Radusher, D.,** 2004. GraphPad Prism. 4.02.
- Rothenbuhler, W.C., Gowen, J.W. & Park, O.W.,** 1952. Androgenesis with Zygogenesis in Gynandromorphic Honeybees (*Apis mellifera* L.). Science 115(2998): 637-638.
- Rousselet, J., Géri, C., Hewitts, G.M. & Lemeunier, F.,** 1998. The chromosomes of *Diprion pini* and *D. similis* (Hymenoptera: Diprionidae): implications for karyotype evolution. Heredity 81: 573-578.
- Rousselet, J., Monti, L., Auger-Rozenberg, M.A., Parker, J.S. & Lemeunier, F.,** 2000. Chromosome Fission Associated with Growth of Ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). Proceedings: Biological Sciences 267(1455): 1819-1823.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M.,** 1992. Wolbachia Endosymbionts Responsible for Various Alterations of Sexuality in Arthropods. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 250(1328): 91-98.
- Salin, C., Deprez, B., Van Bockstaele, D.R., Mahillon, J. & Hance, T.,** 2004. Sex determination mechanism in the hymenopteran parasitoid *Aphidius rhopalosiphii* De Stefani-Peres (Braconidae : Aphidiinae). Belgian Journal of Zoology 134: 15-21.

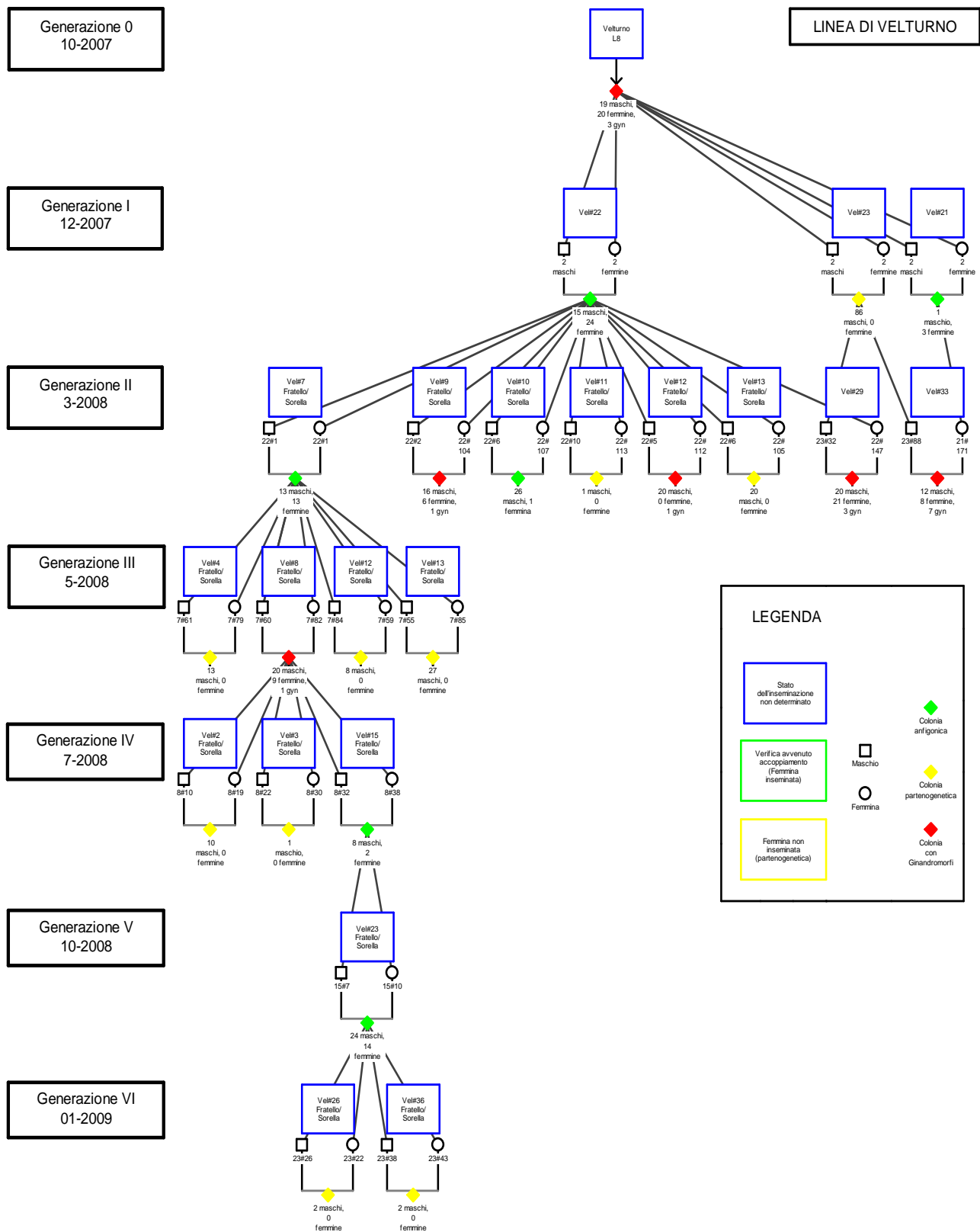
- Sassaman, C. & Fugate, M.**, 1997. Gynandromorphism in Anostraca: multiple mechanisms of origin? *Hydrobiologia* 359(1): 163-169.
- Smith, S.G.**, 1941. A new form of spruce sawfly identified by means. *Scientia Agricola* 21: 245-305.
- Smith, S.G.**, 1960. Cytogenetics of Insects. *Annual Review of Entomology* 5(1): 69-84.
- Smith, S.G. & Wallace, D.R.**, 1971. Allelic sex determination in a lower hymenopteran, *Neodiprion nigroscutum* Midd. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 13: 617-621.
- Stouthamer, R.**, 1997. Gynandromorphs. In: O'Neill, S.L., et al. (eds.) *Influential Passengers - Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, New York, 113-114.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J. & Hurst, G.D.D.**, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53(1): 71-102.
- Turrisi, G. & Bella, S.**, 1999. Prima segnalazione di Diprionidae per la fauna siciliana (Hymenoptera: Symphyta). *Bollettino della Società Entomologica Italiana* 131(2): 179-182.
- van Achterberg, K., Taeger, A. & Blank, S.M.**, 2008. Fauna Europaea: Hymenoptera, Symphyta. Fauna Europaea version 1.3. <http://www.faunaeur.org>.
- van Wilgenburg, E., Driessen, G. & Beukeboom, L.**, 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Frontiers in Zoology* 3: 1.
- Wcislo, W.T., Gonzalez, V.H. & Arneson, L.**, 2004. A review of deviant phenotypes in bees in relation to brood parasitism, and a gynandromorph of *Megalopta genalis* (Hymenoptera: Halictidae). Pp 1443 - 1457. Taylor & Francis.
- Weeks, A.R., Velten, R. & Stouthamer, R.**, 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1526): 1857-1865.
- Werren, J.H.**, 1997. Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Whiting, P.W. & Stancati, M.F.**, 1931. A gynandromorph of *Habrobracon* from a post-reduced binucleate egg. *Biological Bulletin* 61: 481-484.
- Wilson, F.**, 1962. Sex determination and gynandromorph production in aberrant and normal strains of *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyridae). *Australian Journal of Zoology* 10(3): 349-359.

**Wilson, F. & Woolcock, L.T.**, 1960. Temperature determination of sex in a parthenogenetic parasite, *Ooencyrtus submetallicus* (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae). Australian Journal of Zoology 8(2): 153-169.

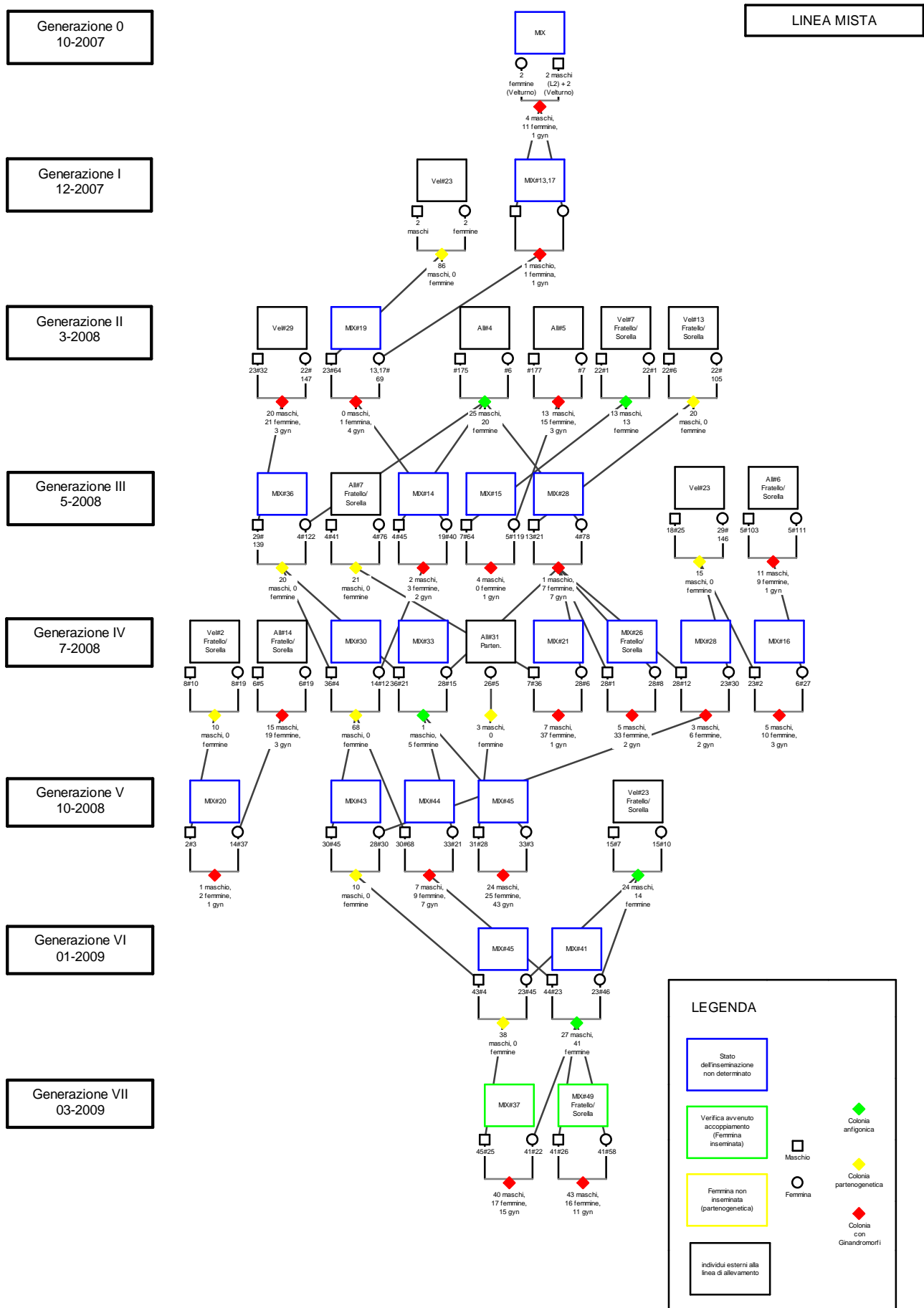
## **6 - APPENDICE**

### **6.1- SCHEMI DI ACCOPPIAMENTO DELLE LINEE DI ALLEVAMENTO**









Generazione 0  
01-2009

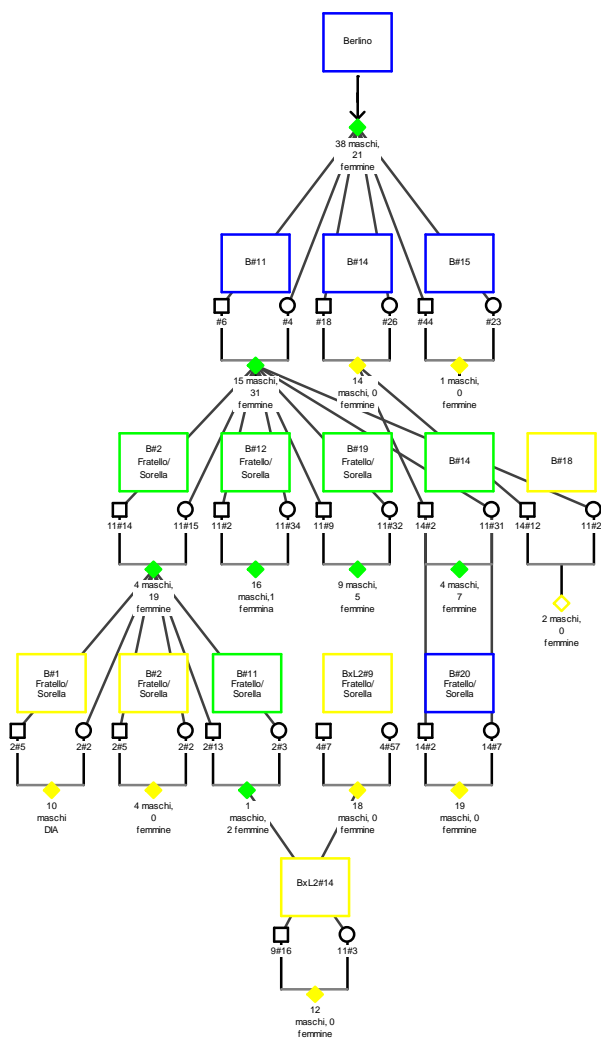
LINEA DI BERLINO

Generazione I  
01-2009

Generazione II  
03-2009

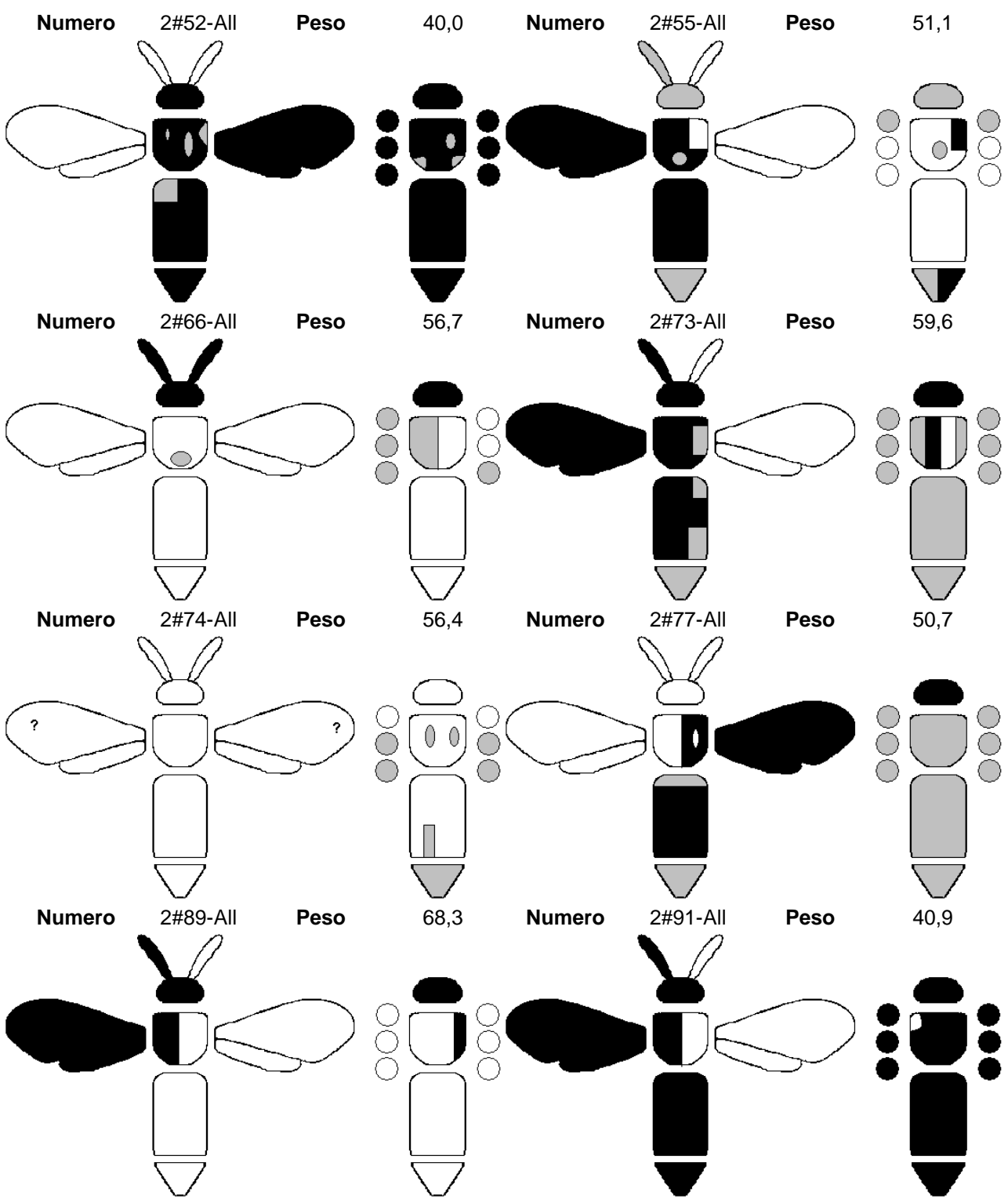
Generazione III  
05-2009

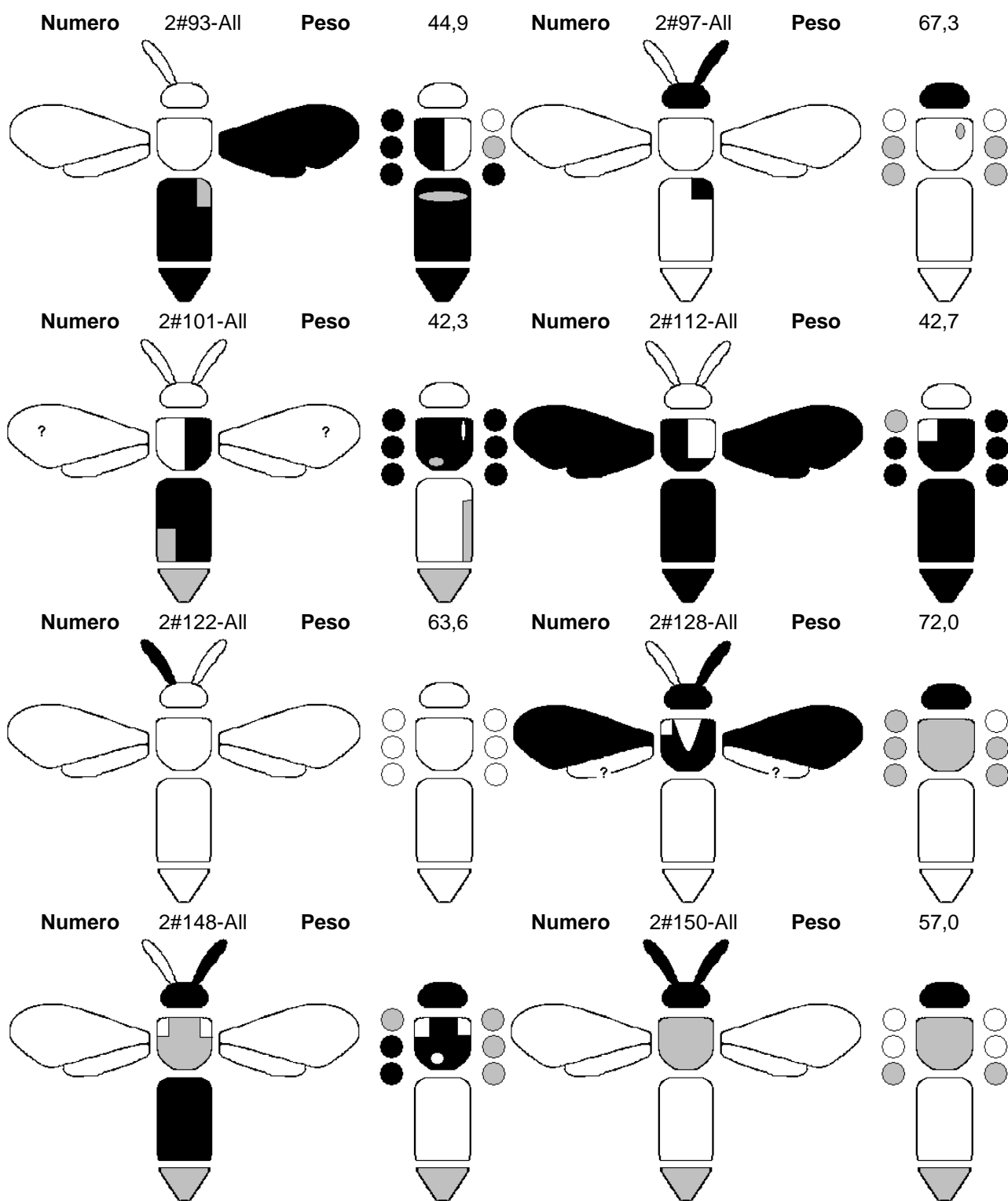
Generazione IV  
08-2009

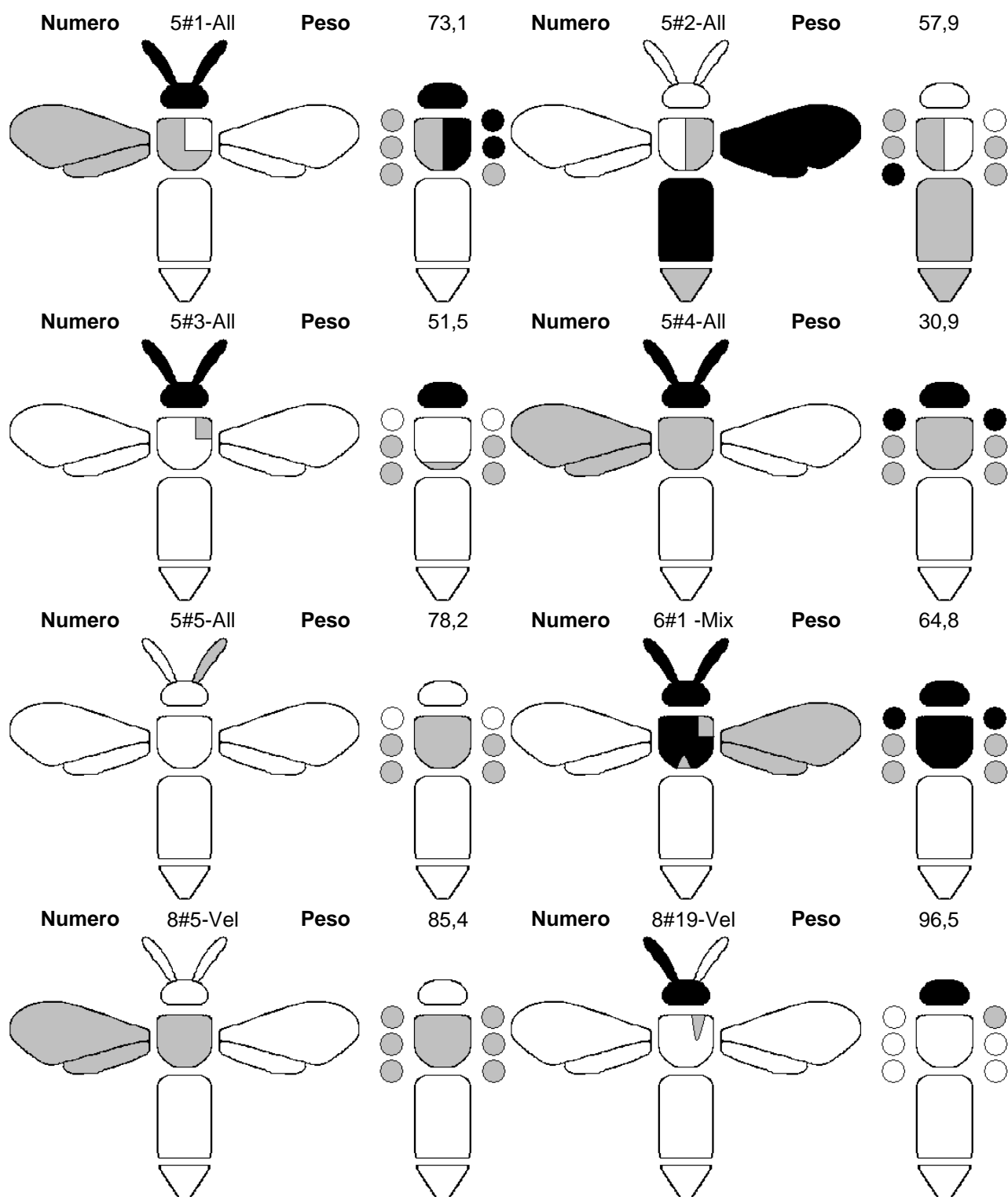


6.2 – SCHEMI DI DISTRIBUZIONE DEI TESSUTI NEGLI INDIVIDUI GINANDROMORFI

Generazione 0





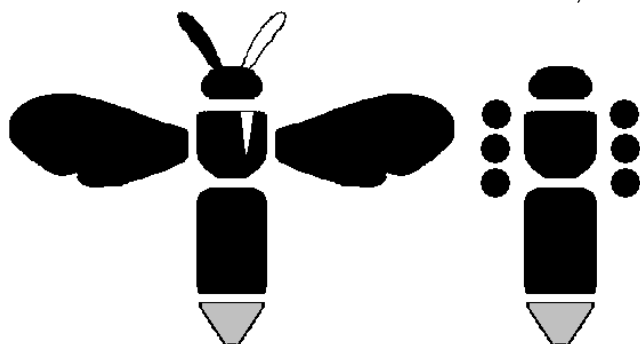


**Numero**

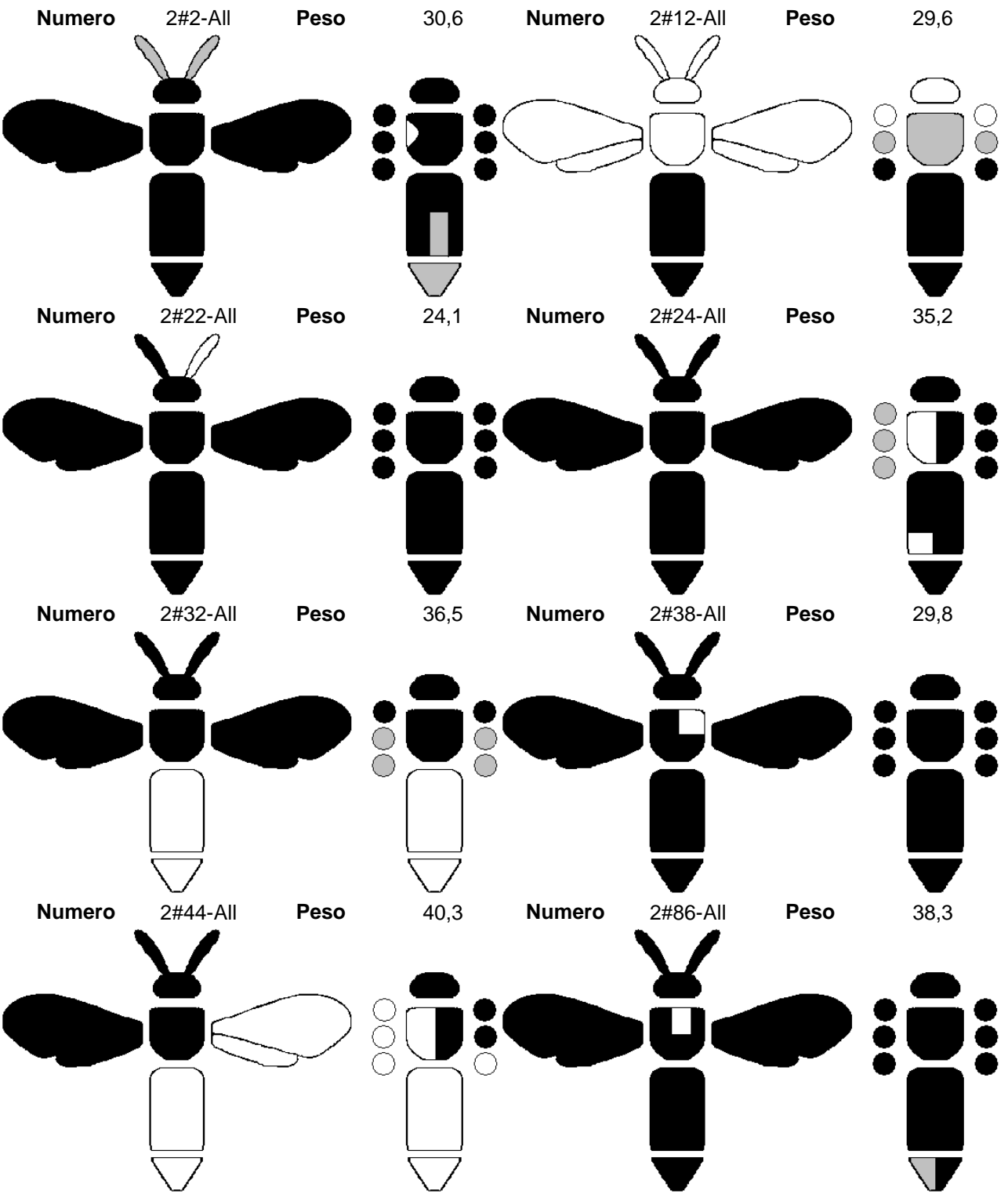
8#30-Vel

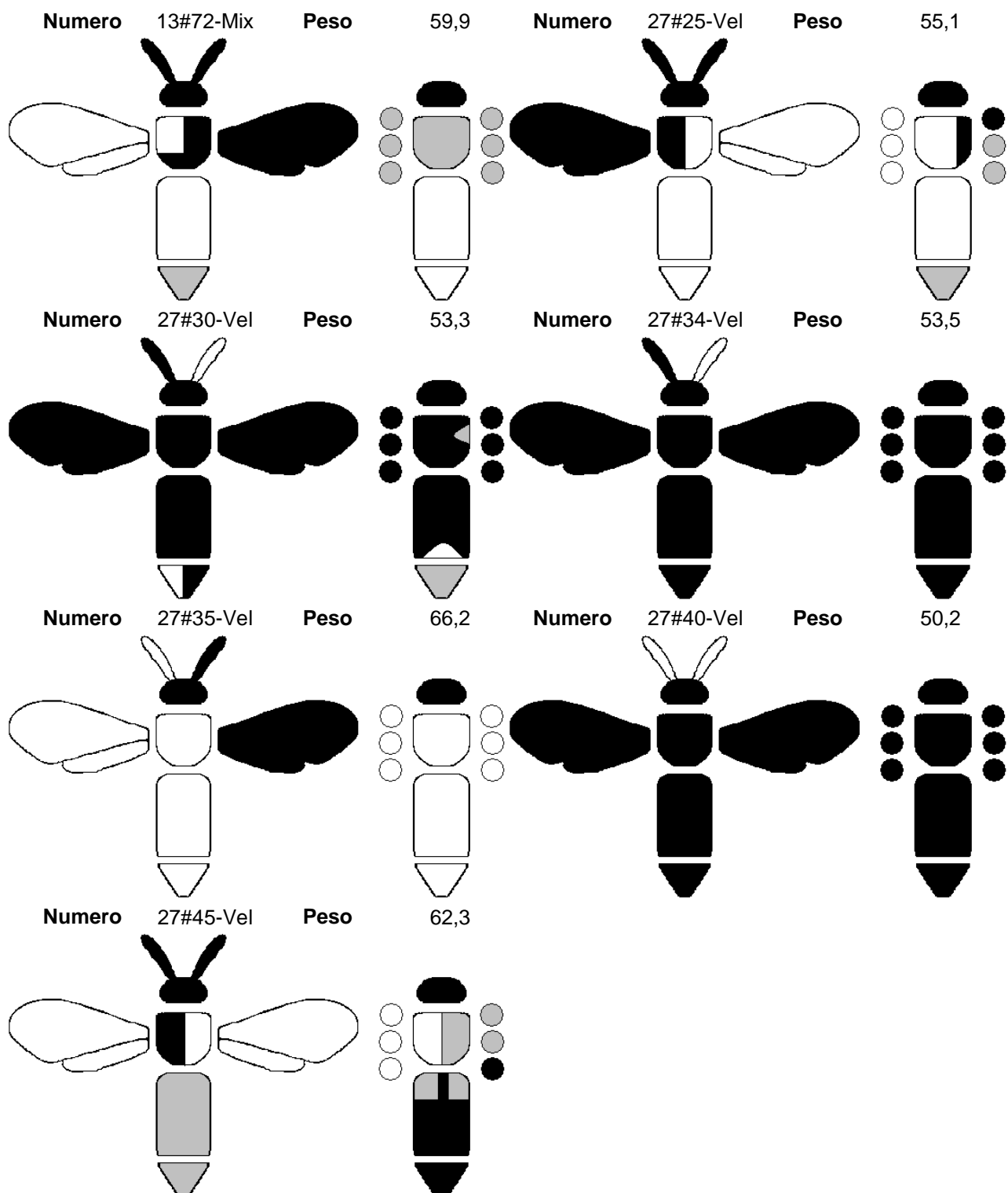
**Peso**

40,1



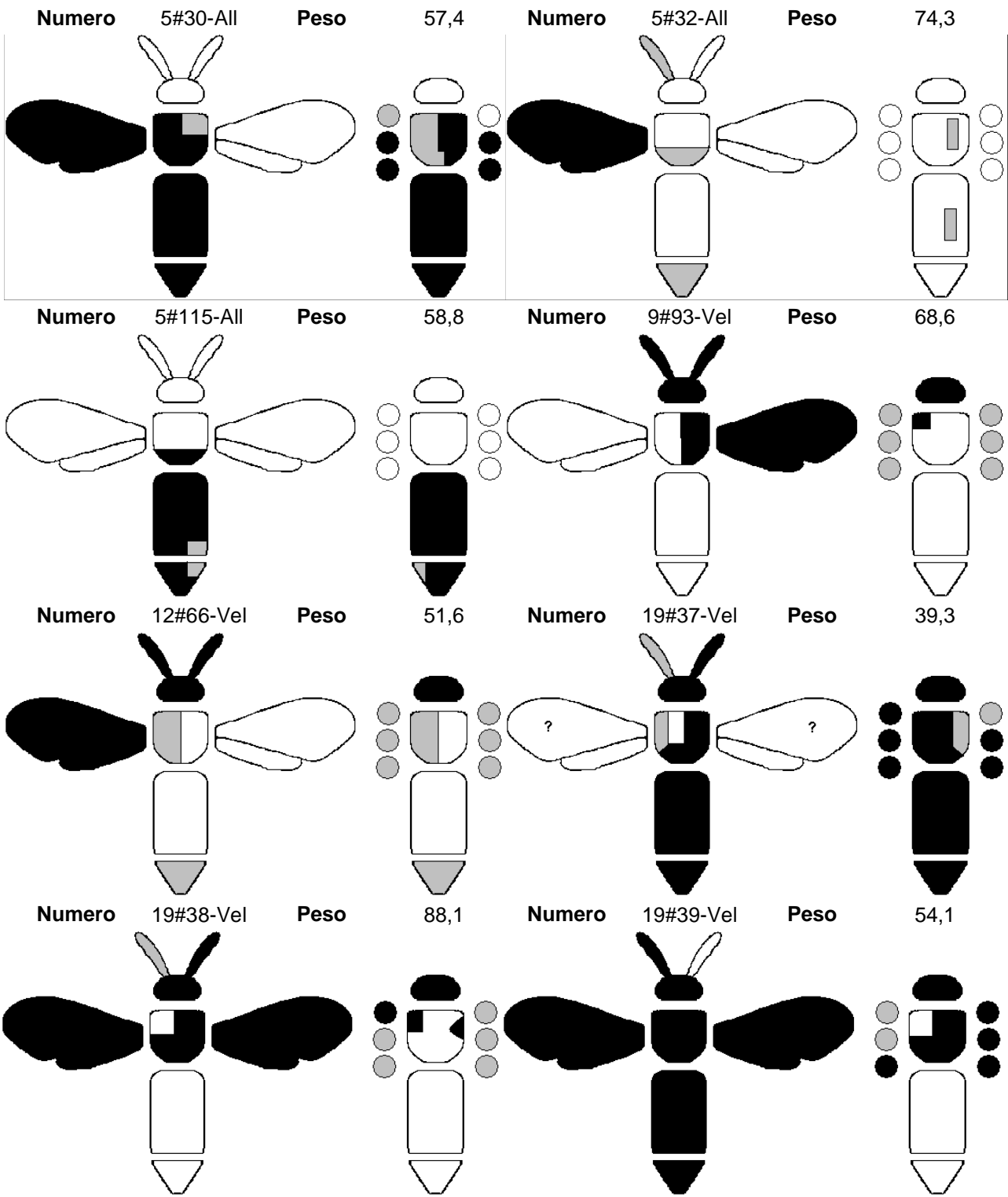
Generazione I

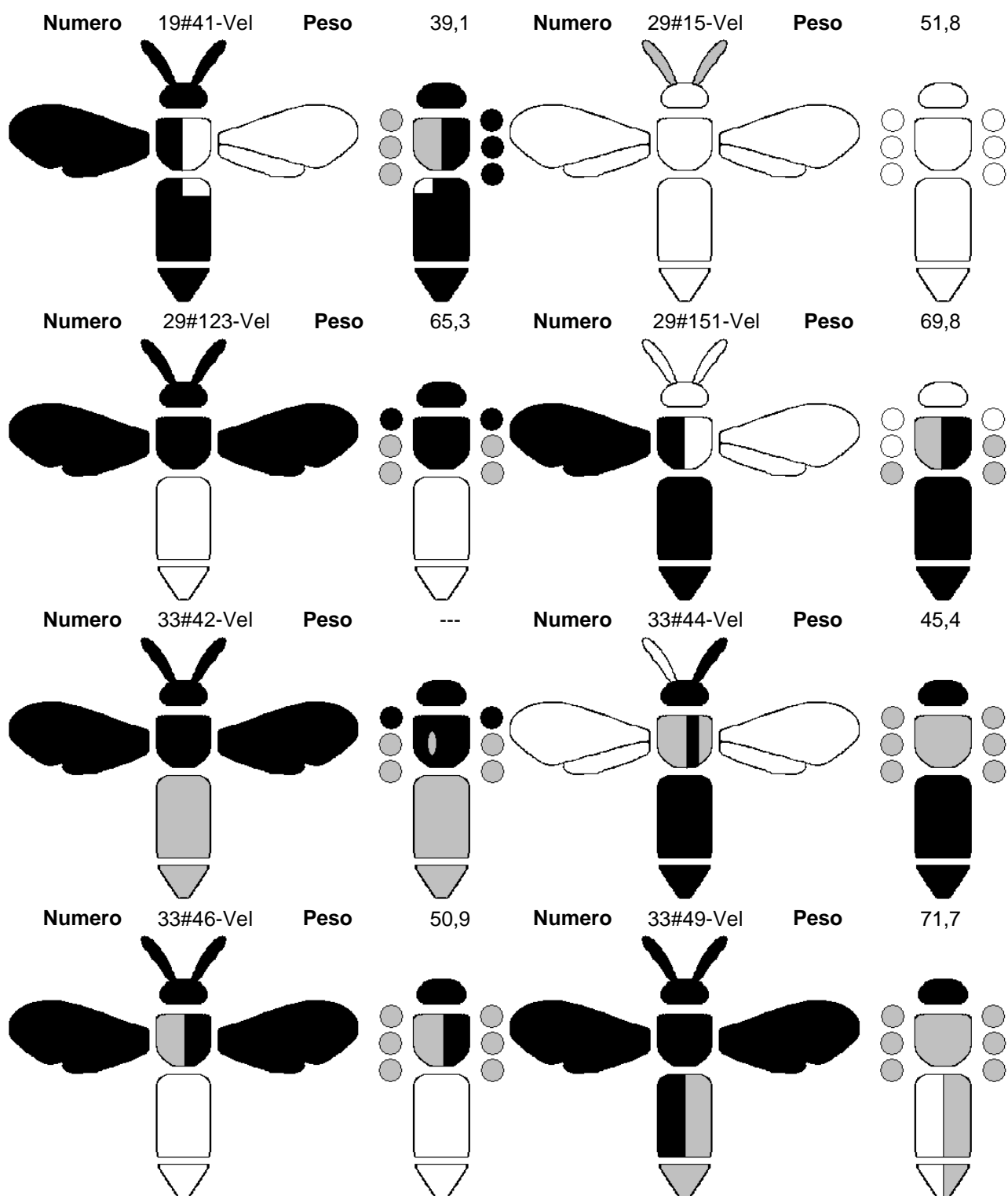


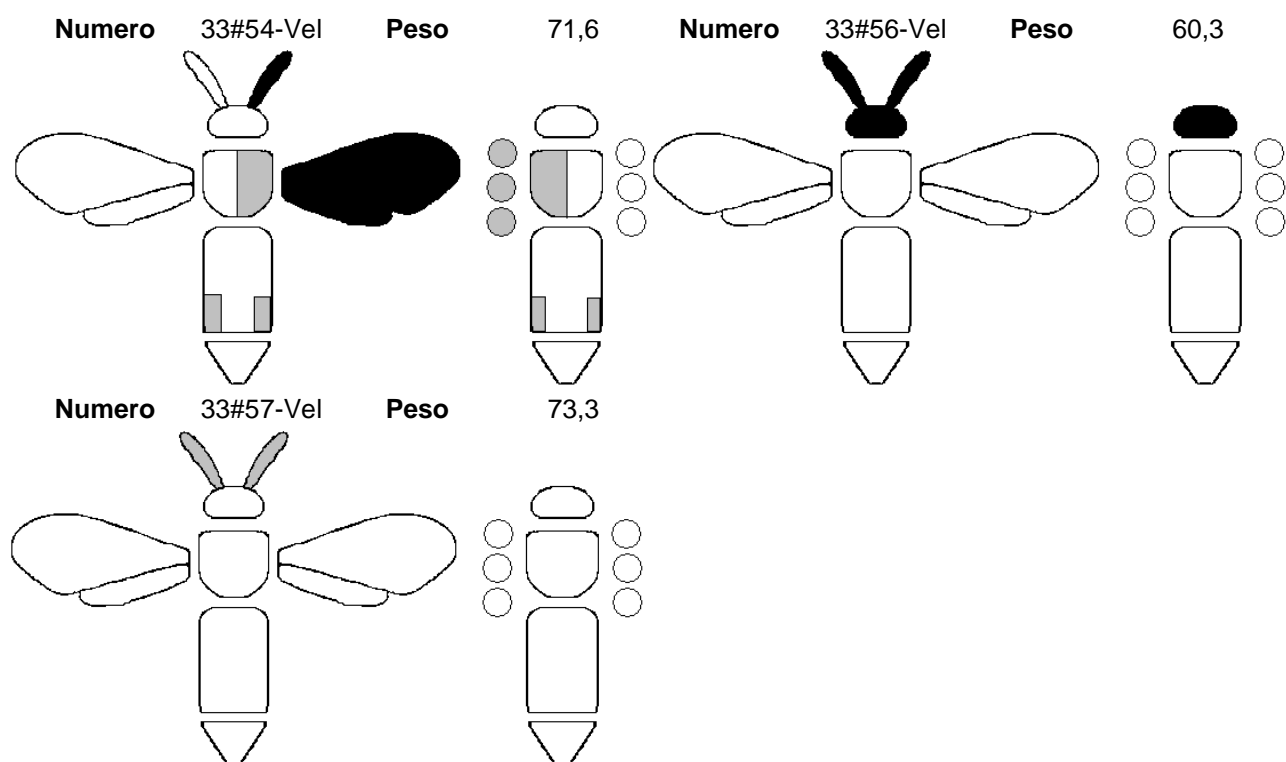




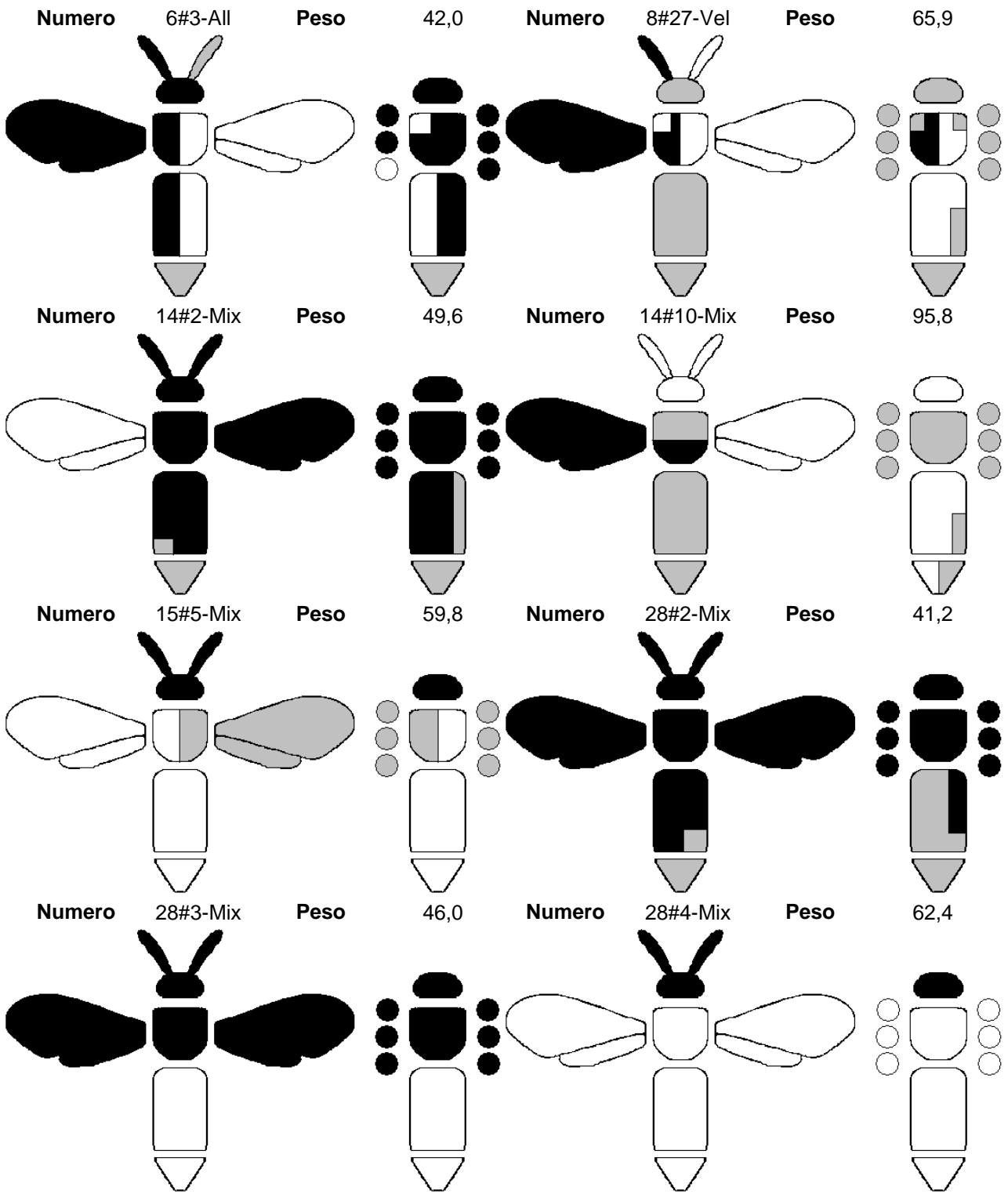
Generazione II

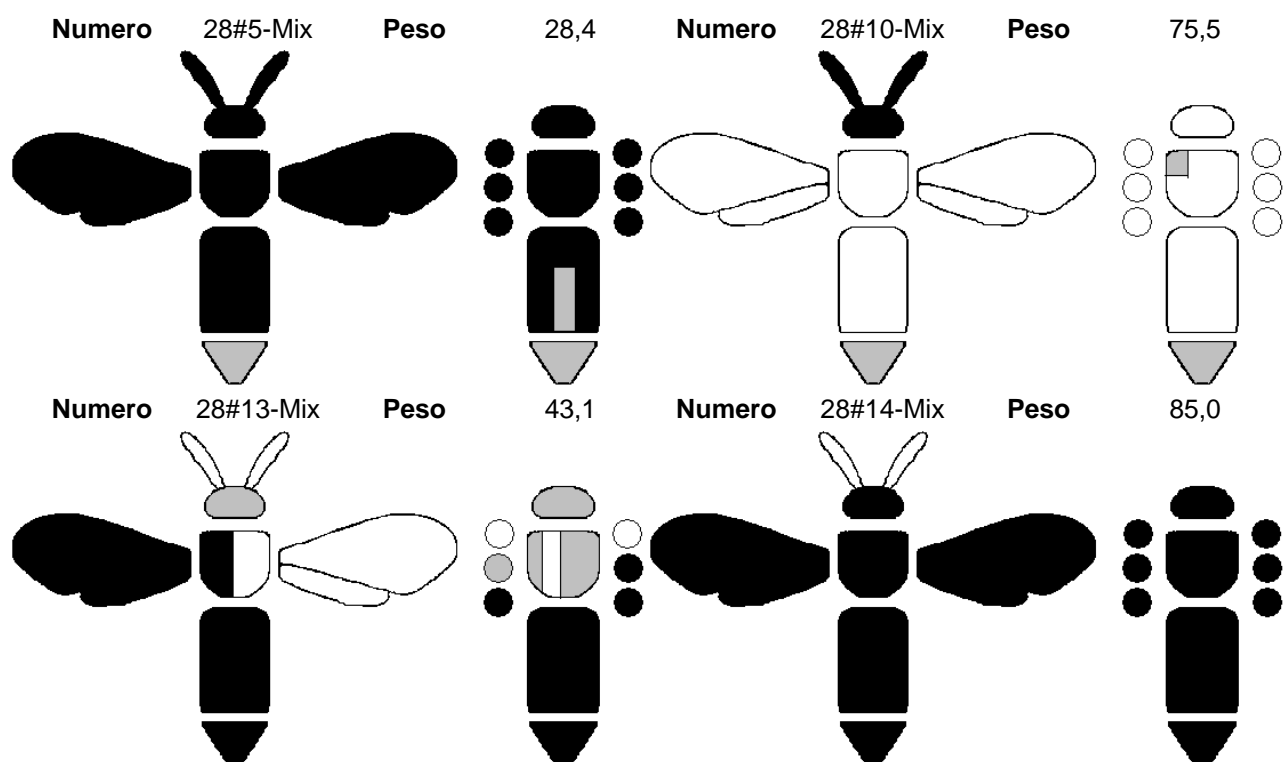




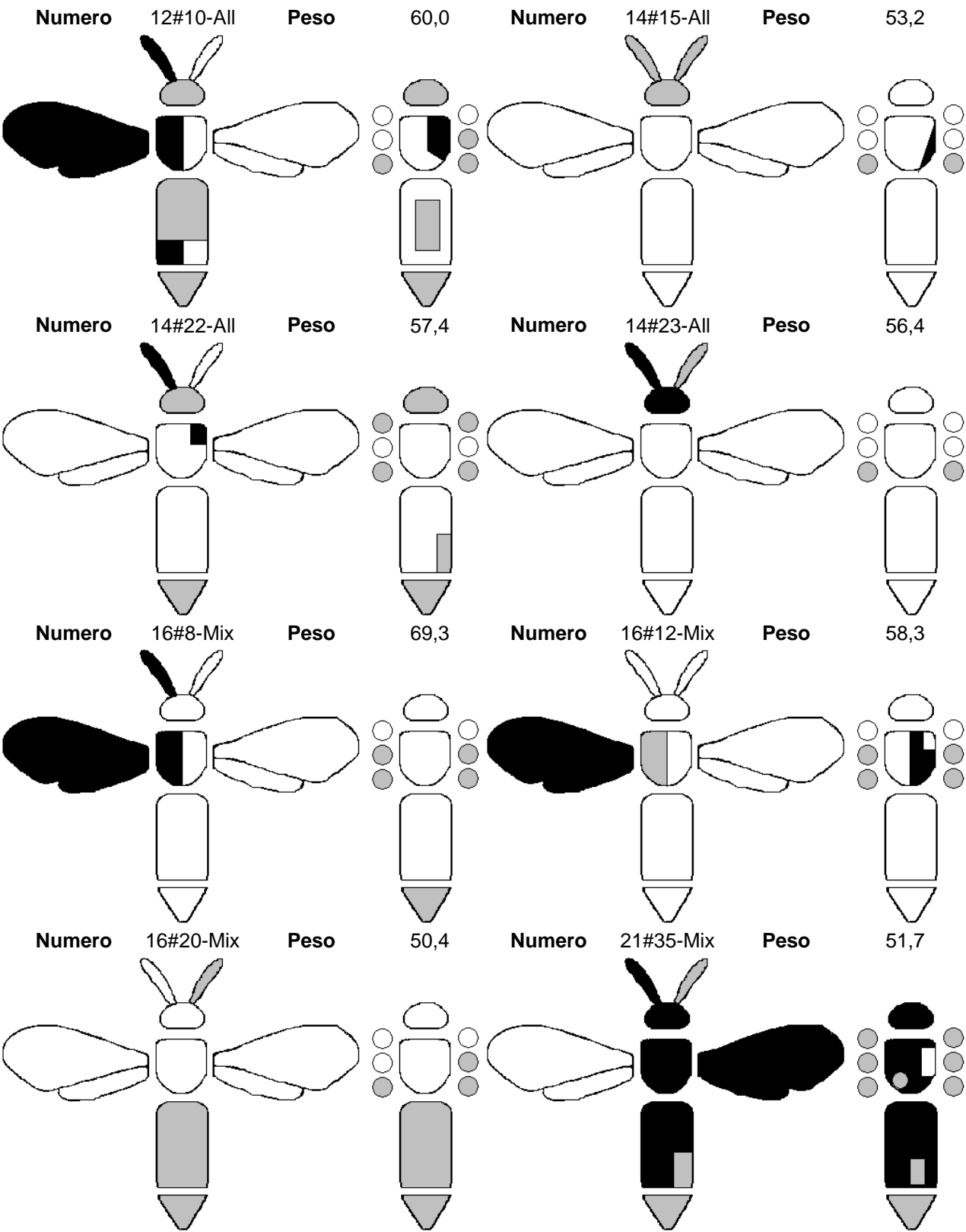


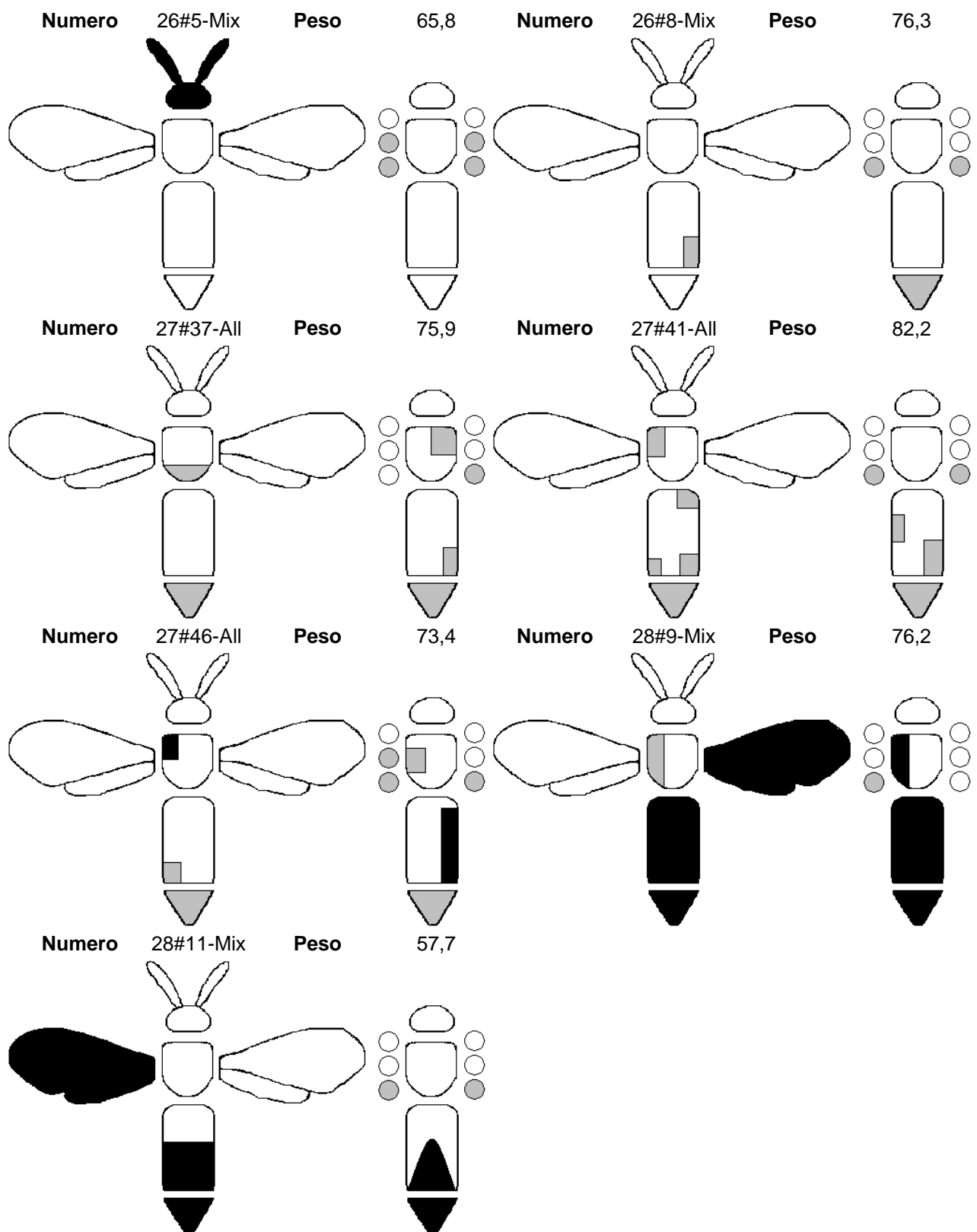
Generazione III



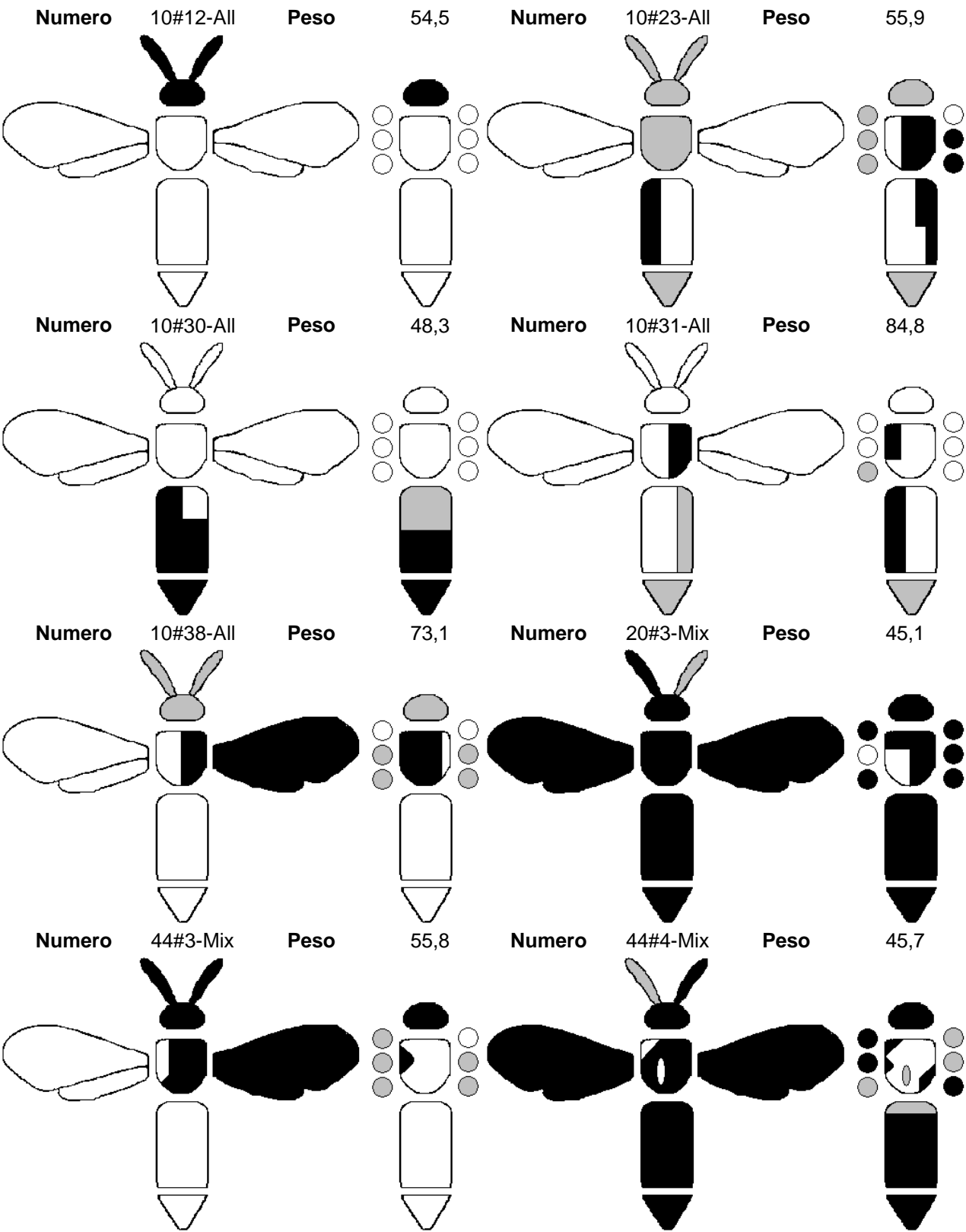


Generazione IV

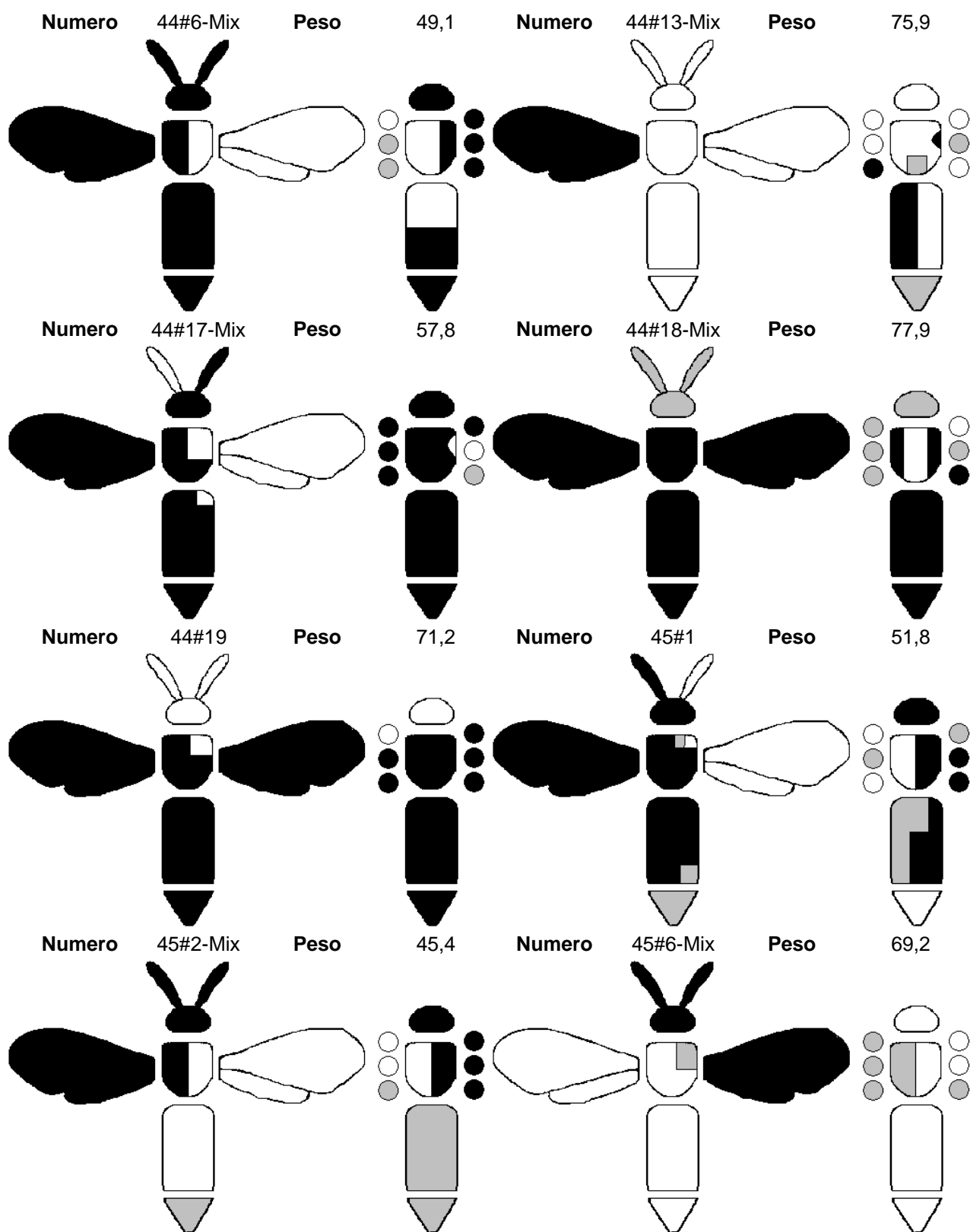


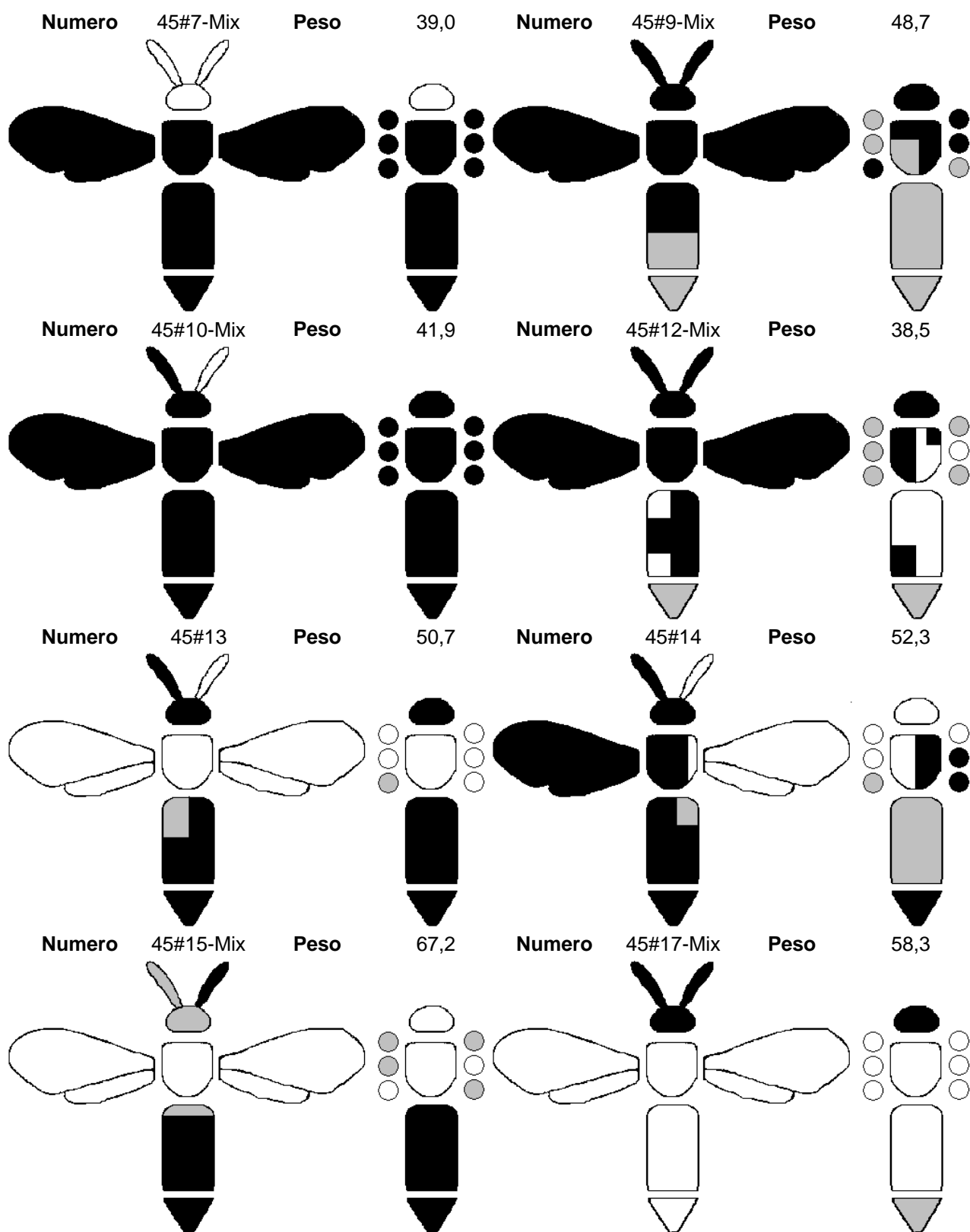


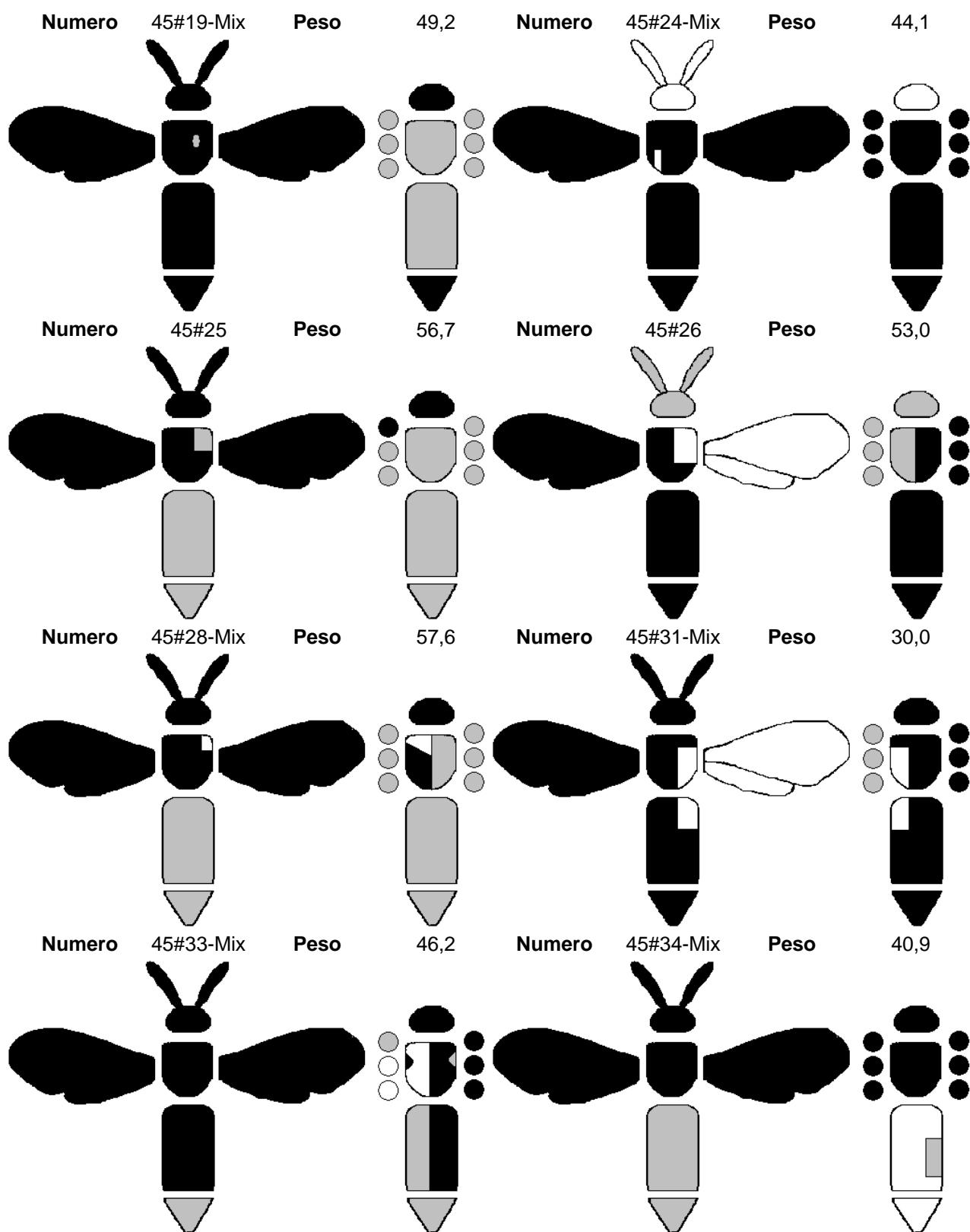
Generazione V

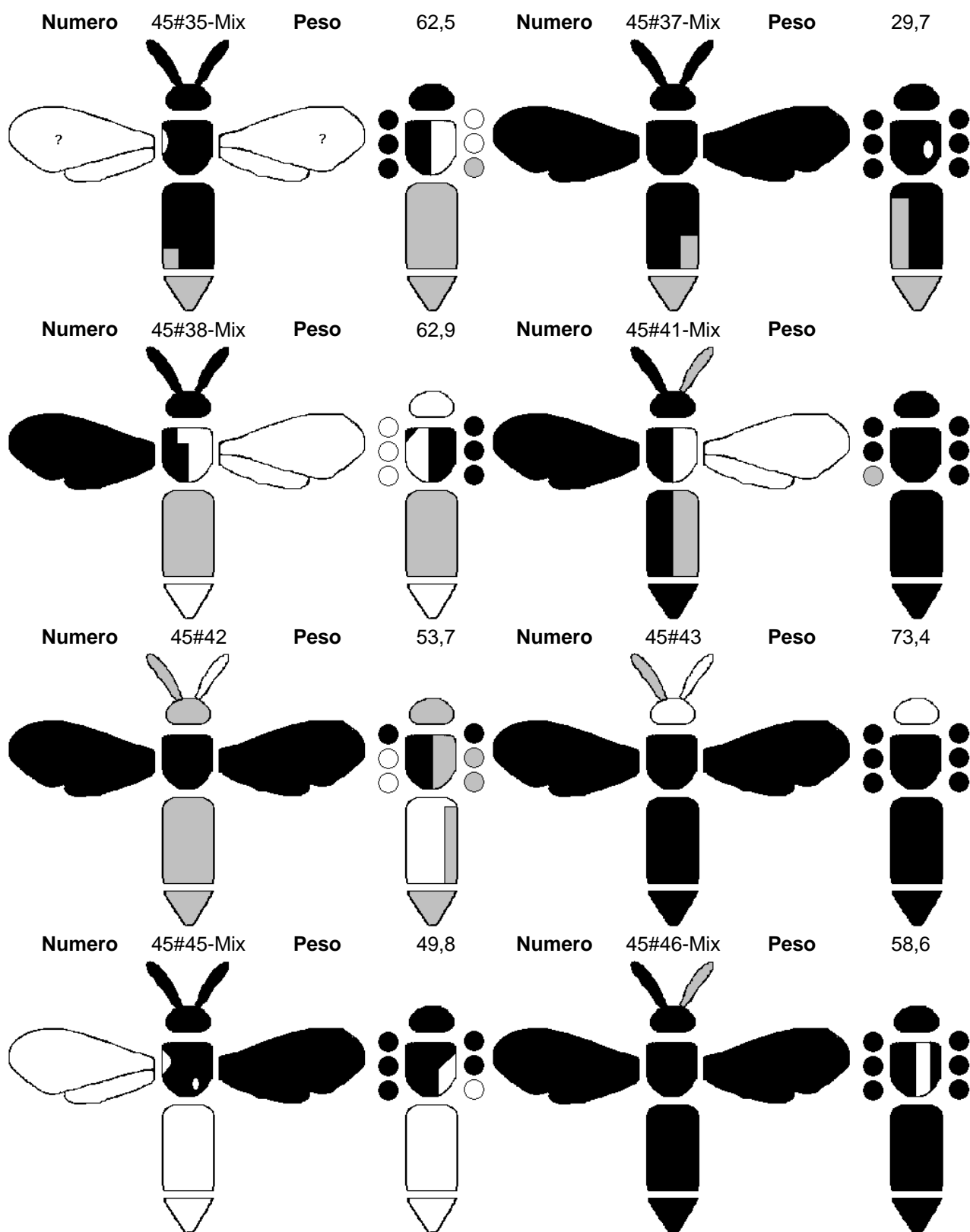


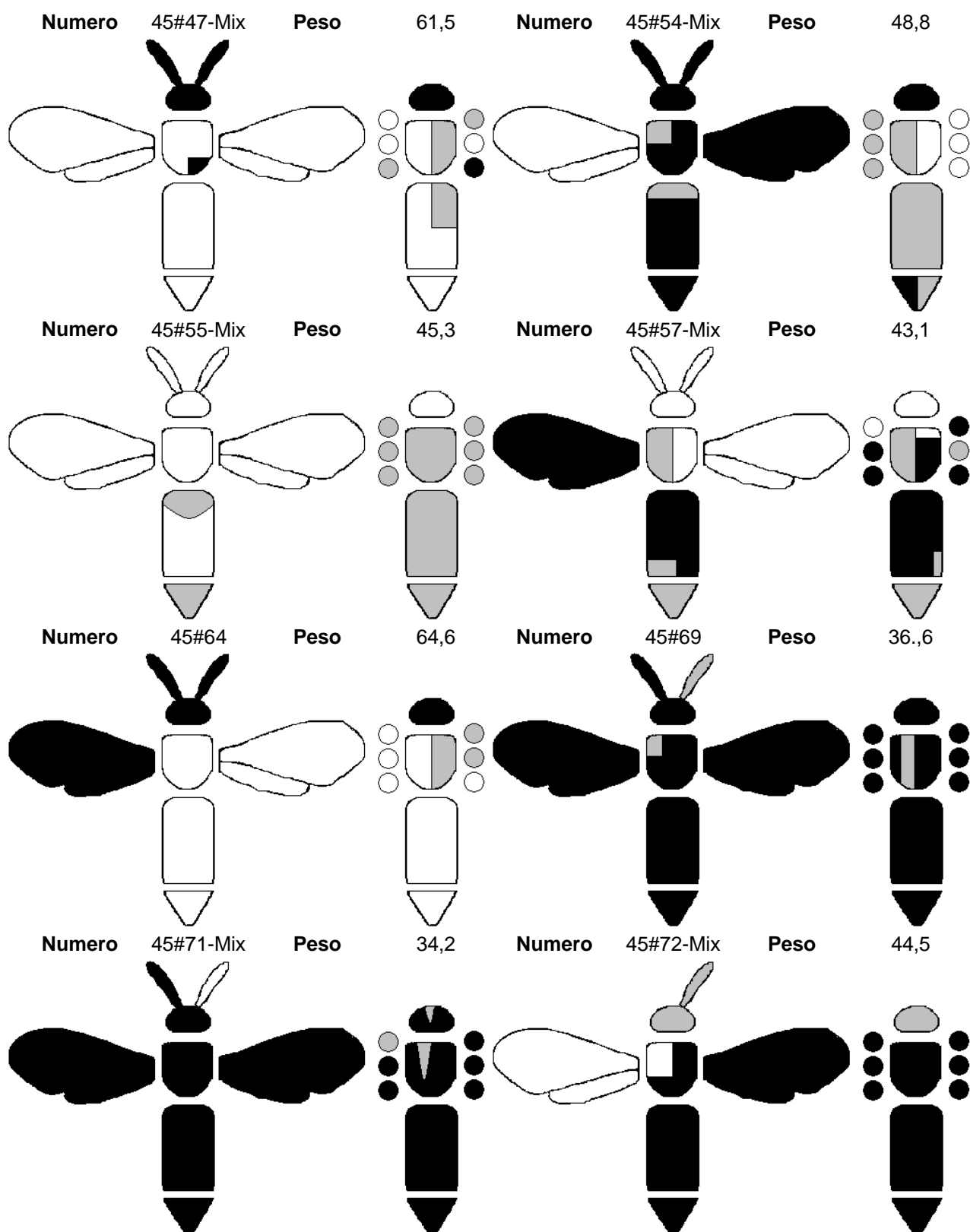


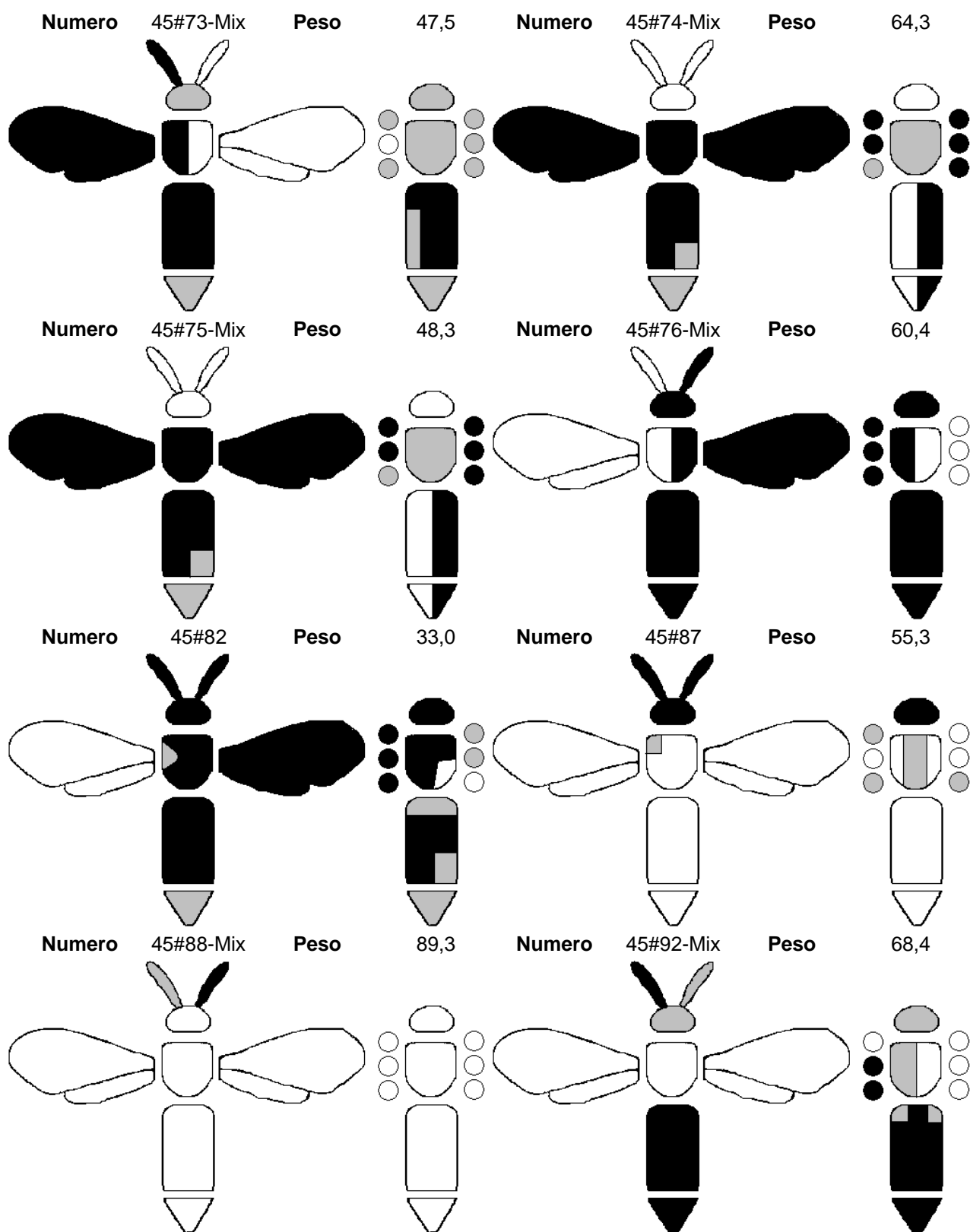




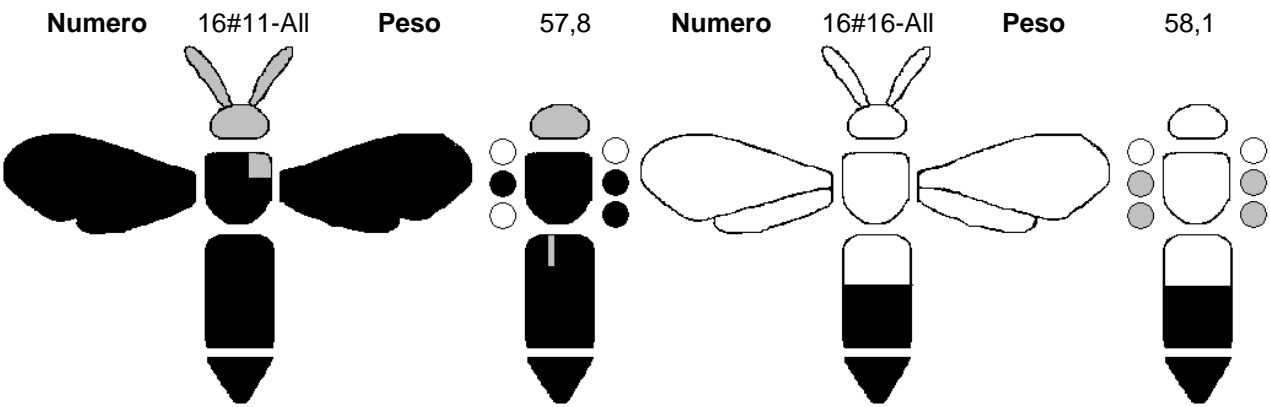




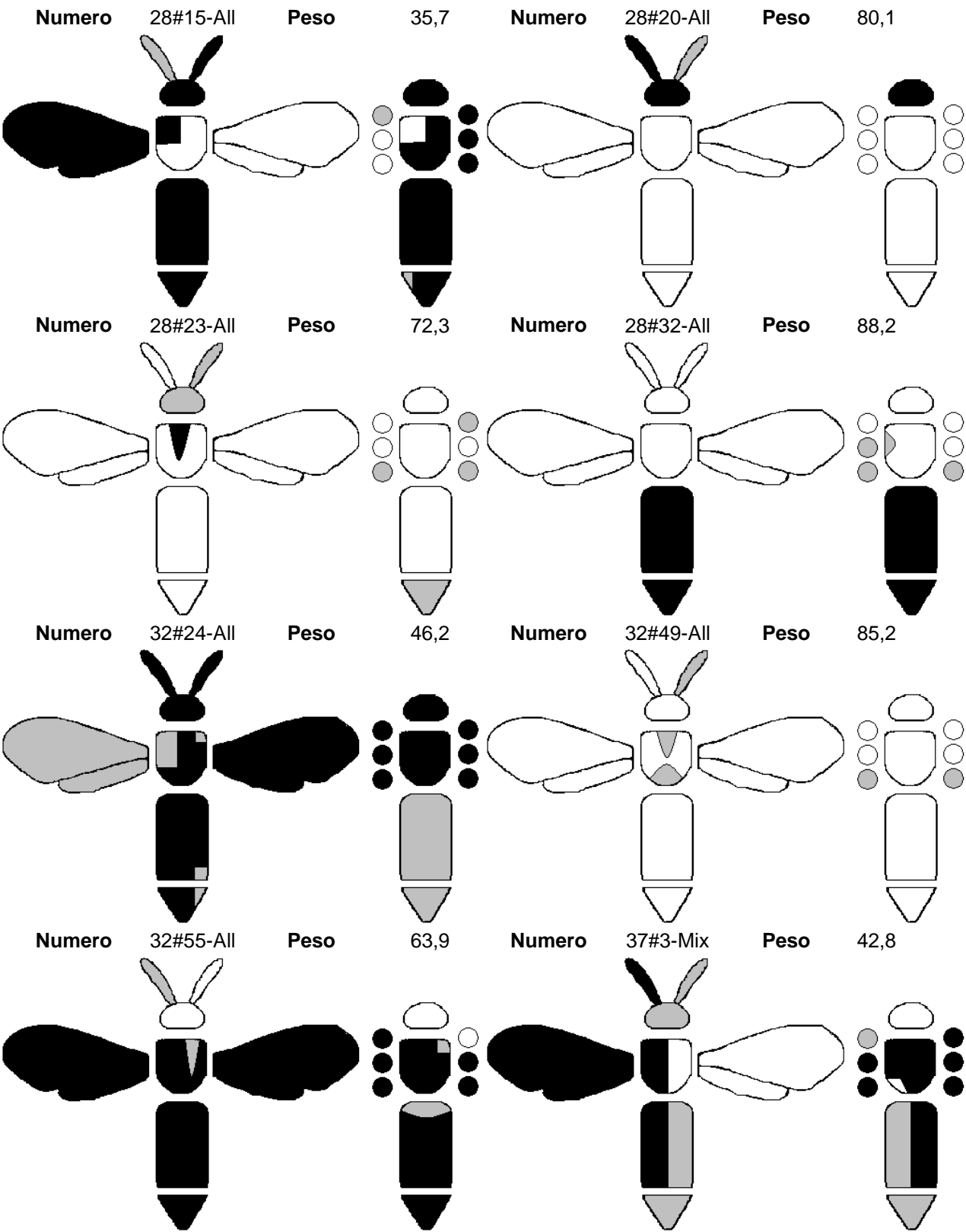




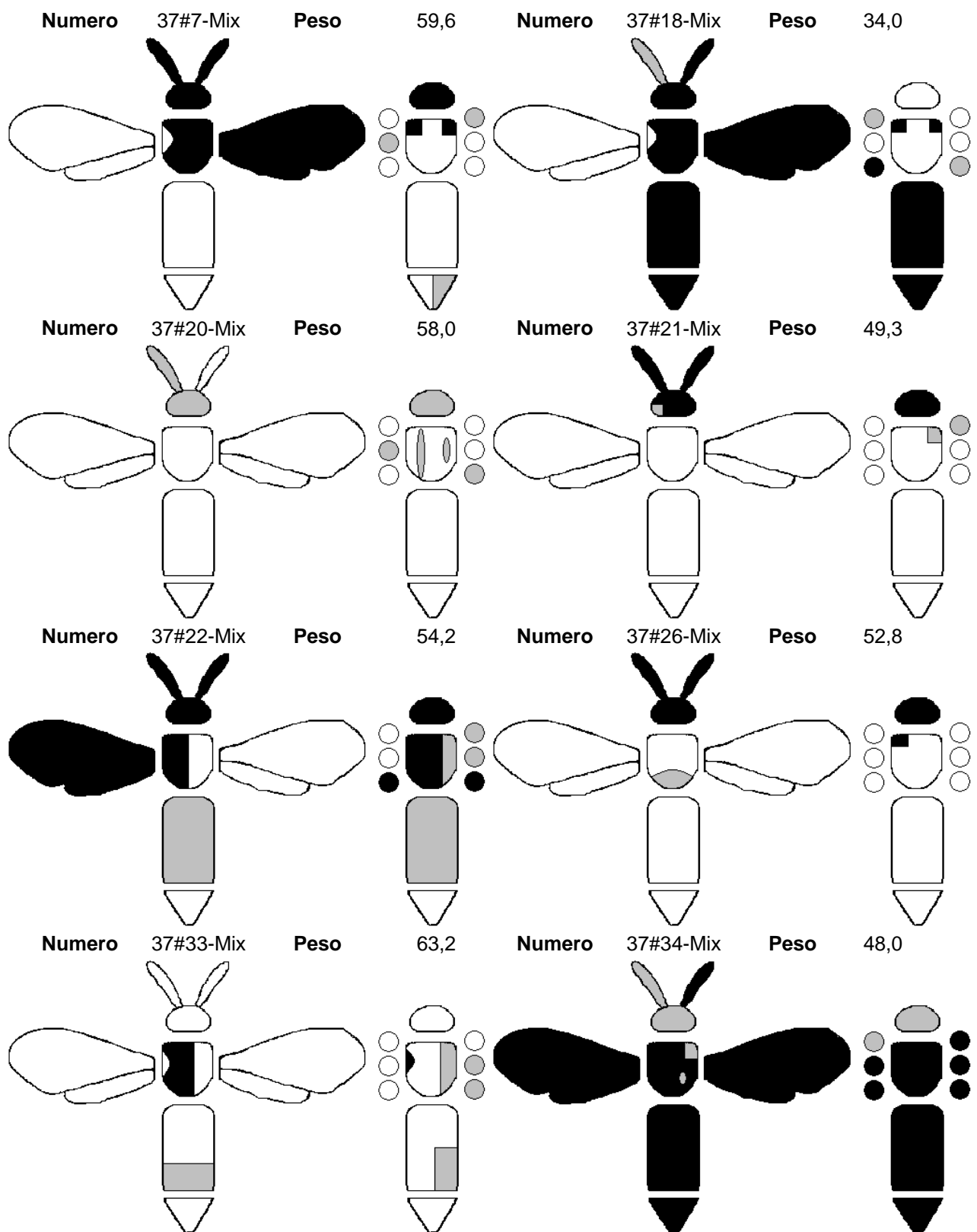
**Generazione VI**

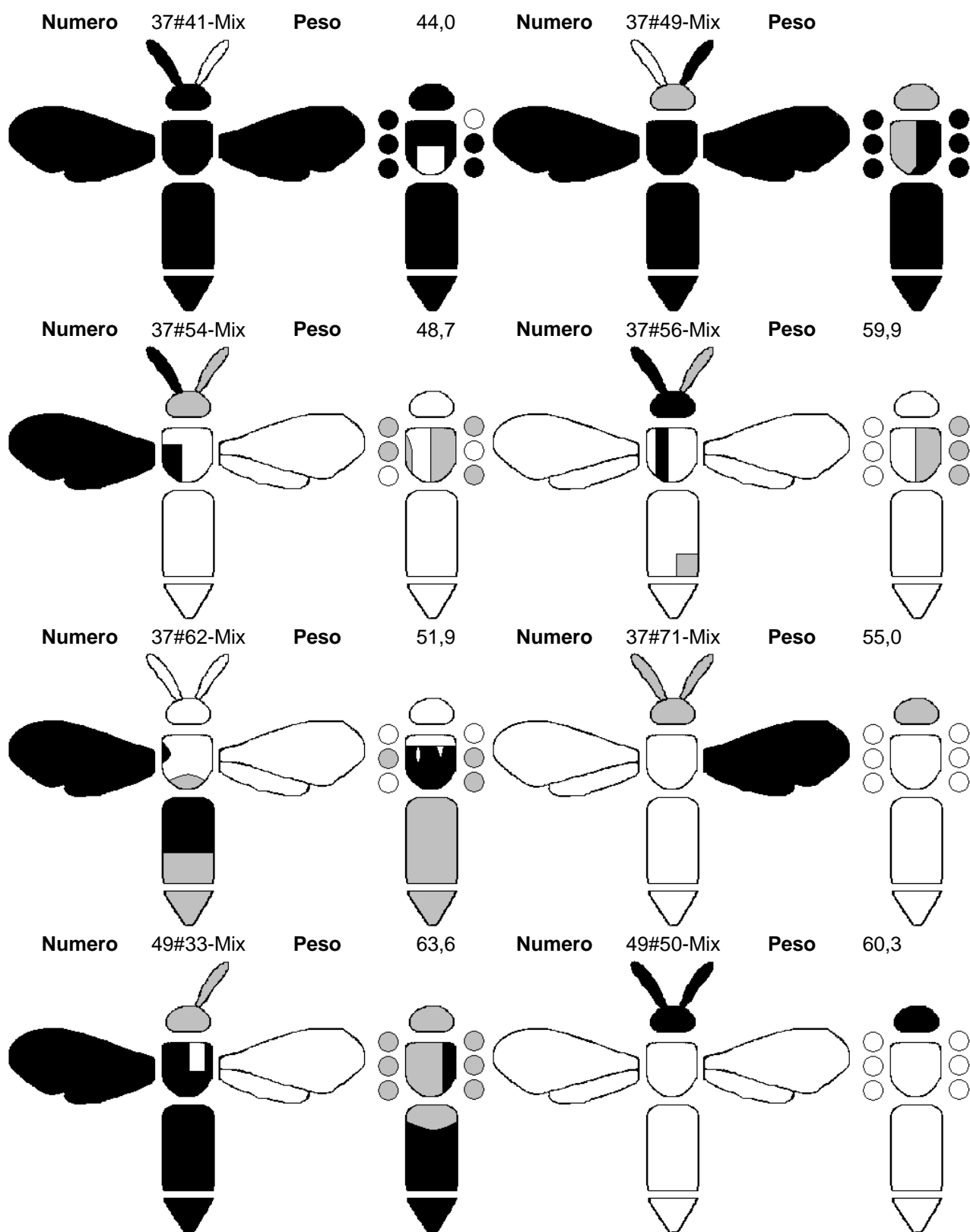


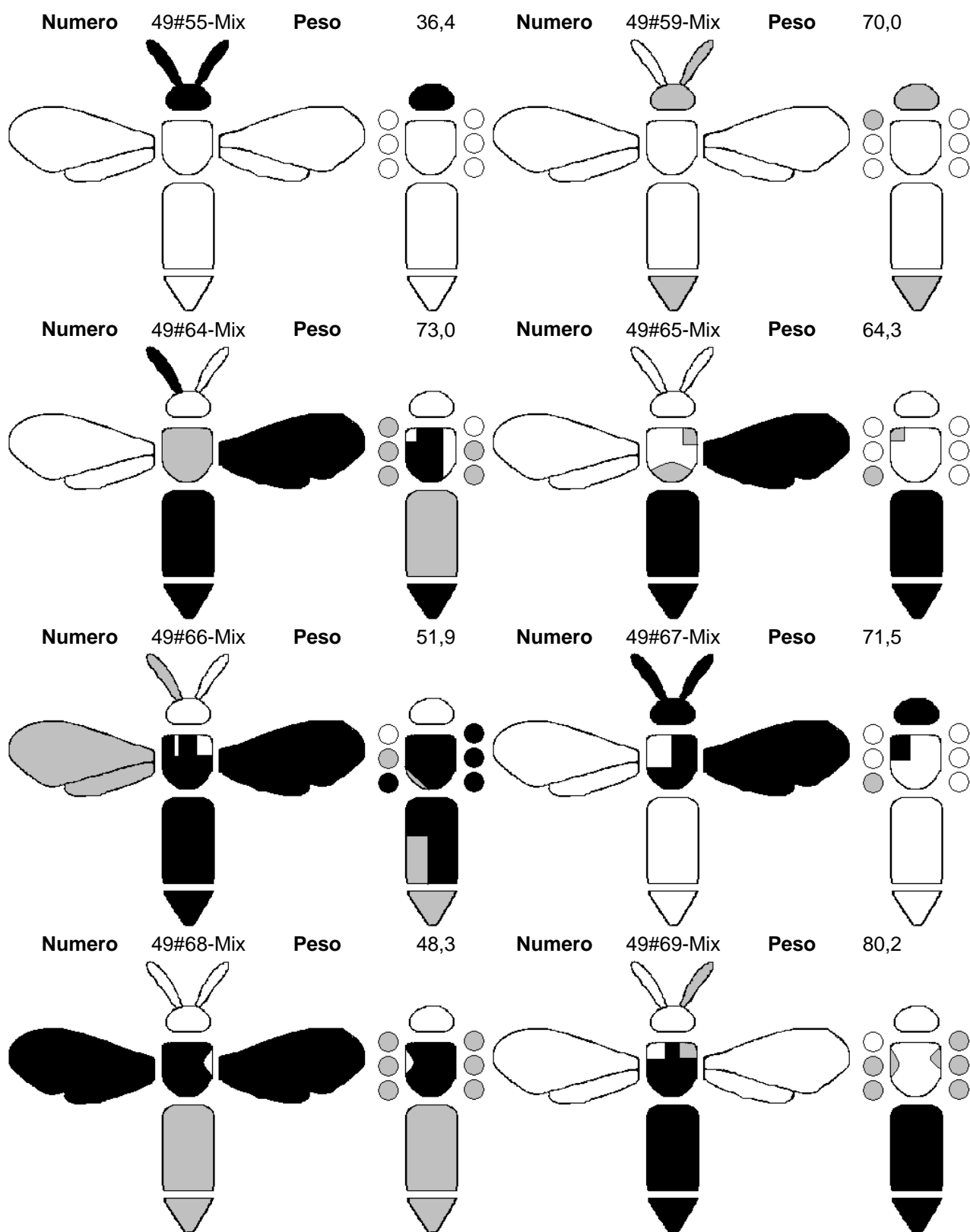
Generazione VII





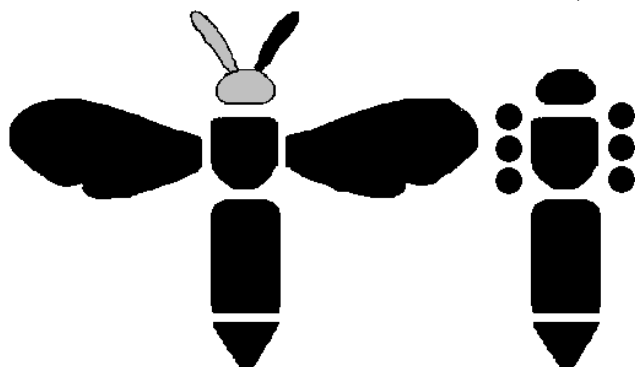






**Numero** 49#73-Mix

**Peso** 40,0



## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare il Prof. Piero Baronio e il Dott. Antonio Martini per avermi dato l'opportunità di muovere il primo passo nel mondo della ricerca attraverso questo dottorato.

Un sentito ringraziamento alla Dott.ssa Maria Luisa Dindo, che sempre mi ha sostenuto, sin dall'inizio della mia esperienza come tesista nell'area di entomologia del DiSTA nell'ormai lontano 2004.

Sicuro di dimenticare qualcuno, ringrazio tutti gli abitanti del terzo piano (ala ovest), il "miglio verde" che innumerevoli volte ho percorso nei miei pellegrinaggi verso la macchinetta del caffè. Citazione particolare per i compagni di merende: il Dottor B., Antonio, Vale, Laura, Camilla, Fabio, le Elise e Alberto.

Ultimi, ma non ultimi, i protagonisti assoluti di questo triennio: i ragazzi residenti nella cella del piano interrato (ala est); mi piacerebbe poter dire che i vostri sacrifici sono stati decisivi per il progresso dell'intera razza umana ... più modestamente vi ringrazio personalmente per avermi fatto capire una volta di più che anche nella creatura più piccola e apparentemente insignificante spesso è nascosto un meraviglioso mistero.

That's all folks!!!